

T 581.17
CER
efe

BIBLIOTECA UCM



5304820957

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLOGICAS
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

**EFFECTOS DEL PROCEDIMIENTO DE EXTRACCION
EN LA ORGANIZACION ESTRUCTURAL Y COMPOSICION QUIMICA
DE LA MATRIZ NUCLEAR EN PLANTAS**

Memoria que presenta

M^a ANGELES CEREZUELA ROSIQUE

para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

R.- 20.042



M^a ANGELES CEREZUELA
Licenciada en Ciencias Biológicas

V^o B^o LA DIRECTORA

Dra Susana Moreno y Díaz de la Espina
Colaboradora Científica
Centro de Investigaciones Biológicas
C.S.I.C.

MADRID ENERO 1991

A todos los que con su apoyo y estímulo han hecho posible la realización de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud a la Dra Susana Moreno Diaz de la Espina, por la dirección de esta Tesis y por su constante y valiosa dedicación y ayuda.

Tambien quiero agradecer al Prof. Benjamin Fernandez Ruiz, Vicerector de la U.C.M., el aceptar amablemente ser el ponente-tutor de esta Tesis.

Agradezco al Centro de Investigaciones Biológicas el haber puesto a mi disposición el instrumental y material necesario para la realización de esta Tesis, y a los miembros de la unidad de Estructuras Celulares Dra M^a Encarnación Fernandez-Gómez, Ana Minguez, Luis Fco. Garcia, Mercedes Carnota, Marisa Ruiz y Nieves Fonturbel la ayuda desinteresada y la colaboración prestada.

En especial quiero agradecer a la Dra M^a Teresa Serra los consejos recibidos en la realización de las electroforesis de la matriz y a los Drs Olga Echeverría y Francisco Javier Medina, la orientación recibida en la realización de la reconstrucción tridimensional.

Agradezco también a Eloy Blanco y M^a Dolores Guirao del Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Investigaciones Biológicas la amable atención prestada. En especial agradezco a José Blanco la colaboración en el trabajo fotográfico de la Tesis.

Finalmente quiero agradecer al Ministerio de Educación y Ciencia el haberme otorgado una licencia por estudios, lo que ha posibilitado imprimir un gran impulso a la realización de la tesis.

INDICE

RESUMEN.....	2
INTRODUCCION.....	7
1.Ultraestructura de la matriz nuclear.....	9
2.Composición química de la matriz nuclear.....	10
2.1.Composición polipeptídica de la matriz nuclear.....	11
2.1.1.Composición polipeptídica de la fracción lámina-poros.....	12
2.1.2.Composición polipeptídica de la matriz nucleolar.....	18
2.1.3.Composición polipeptídica de la matriz interna.....	19
2.2.El ADN matricial.....	22
2.3.El ARN de la matriz nuclear.....	23
3.Correspondencia "in situ" de la matriz interfásica.....	24
4.El esqueleto cromosómico.....	27
4.1.Composición química del esqueleto cromosómico.....	27
4.2.El ADN del esqueleto cromosómico.....	28
4.3.Relación matriz nuclear-esqueleto cromosómico.....	28
5.La matriz nuclear durante el ciclo celular.....	29
5.1.Distribución topológica de las proteínas matriciales durante el ciclo celular.....	29
5.2.Asociación de proteínas matriciales con los cromosomas metafásicos.....	30
6.Funciones de la matriz nuclear.....	31
6.1.Organización del ADN lineal en "loops".....	31
6.2.Duplicación del ADN en la matriz.....	33
6.3.La matriz y el metabolismo del ARN.....	34
6.4.La matriz y la acción hormonal.....	36
7.Efectos del procedimiento de extracción sobre la ultraestructura y composición química de la matriz nuclear.....	37
7.1.Procedimiento general de obtención de matrices nucleares.....	37
7.2.Variaciones del procedimiento de extracción y su repercusión sobre las estructuras matriciales	40
OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	46
MATERIAL Y METODOS.....	50
1.Material de estudio.....	50
2.Método de cultivo de meristemos radicales.....	50
3.Aislamiento de núcleos meristemáticos.....	50
4.Aislamiento de matrices nucleares.....	52
5.Control de la eliminación del ADN y ARN en los sucesivos pasos de la extracción mediante fluorescencia.....	58

6. Procesamiento de muestras para microscopía electrónica...	61
6.1. Métodos de fijación.....	61
6.2. Deshidratación.....	65
6.3. Inclusión.....	66
6.4. Realización de cortes ultrafinos para observación al microscopio electrónico.....	69
6.5. Tinción cortes ultrafinos.....	72
6.6. Inmunolocalización de ADN.....	76
6.7. Observación al microscopio electrónico.....	78
6.8. Reconstrucción tridimensional a partir de cortes seriados.....	78
6.9. Cuantificación morfométrica.....	82
7. Procesamiento de muestras para electroforesis SDS-PAGE...	83
7.1. Determinación de las proteínas.....	83
7.2. Electroforesis.....	86
 RESULTADOS.....	 93
1. Ultraestructura del núcleo "in situ" y aislado en células meristemáticas de Allium cepa.....	93
1.1. Organización estructural del núcleo "in situ".....	93
1.2. Organización estructural del núcleo aislado.....	96
2. Matriz nuclear obtenida por el procedimiento de Berezney y Coffey (1974).....	101
2.1. Morfología y ultraestructura.....	101
2.2. Composición polipeptídica.....	101
3. Matriz nuclear obtenida realizando las digestiones enzimáticas antes de la extracción salina.....	103
3.1. Control de la eliminación del ADN por fluorescencia....	103
3.2. Morfología y ultraestructura.....	104
3.3. Composición polipeptídica.....	109
4. Matrices nucleares obtenidas por tratamiento con TTNa y DTT.....	110
4.1. Morfología y ultraestructura.....	111
4.2. Composición polipeptídica.....	113
5. Estudio comparativo de las distintas matrices.....	114
5.1. Comparación de su ultraestructura.....	114
5.2. Comparación de su composición polipeptídica.....	115
6. Reconstrucción tridimensional de la matriz nuclear.....	116
7. Ácidos nucleicos en la matriz nuclear.....	118
7.1. Fluorescencia: doble marcado DAPI y PIRONINA.....	118
7.2. Inmunolocalización del ADN	120
7.3. Tinción preferencial para ribonucleoproteínas.....	121
7.4. Tinción con oxinitrato de bismuto.....	122
 DISCUSION.....	 124
1. Distintos métodos de obtención de la matriz nuclear.....	124
1.1. Discusión de los métodos experimentales utilizados.....	124
1.1.1. Realización de las digestiones enzimáticas antes de la extracción salina.....	124

1.1.2.Induccion de puentes disulfuro.....	126
1.1.3.Cationes divalentes en los tampones de extracción....	128
1.2.Análisis estructural de las matrices obtenidas por los distintos procedimientos.....	130
1.2.1.Ultraestructura de las matrices nucleares obtenidas realizando las digestiones enzimáticas antes de la extracción salina.....	130
1.2.2.Ultraestructura de las matrices obtenidas por tratamiento con TTNa y DTT.....	137
1.2.3.Cationes divalentes en los tampones de extracción....	140
1.3.Composición polipeptídica de la matriz nuclear.....	142
1.3.1.Efecto de la inversión de la secuencia extractiva sobre la composición polipeptídica de la matriz	142
1.3.2.Composición polipeptídica de las matrices nucleares obtenidas por tratamiento con TTNa y DTT.....	142
1.3.3.Componentes polipeptídicos de la matriz nuclear.....	144
2.Acidos nucleicos en la matriz nuclear.....	149
2.1.Discusión de los métodos utilizados en la detección de ácidos nucleicos.....	149
2.2.ADN y dominios de cromatina en la matriz nuclear.....	154
2.3.ARN y dominios ribonucleoproteicos en la matriz nuclear	157
3.Proteínas fosforiladas de la matriz nuclear.....	161
3.1.Discusión del método de detección empleado: Tinción con oxinitrato de bismuto	161
3.2.Proteínas fosforiladas de la matriz nuclear.....	163
4.Organización estructural de la matriz nuclear.....	169
5.Organización tridimensional.....	171
6.Realidad "in situ" de la matriz nuclear.....	173
6.1.Evolución de los componentes matriciales durante el procedimiento extractivo.....	175
6.2.Correspondencias citoquímicas de los componentes matriciales en relación al núcleo aislado.....	183
CONCLUSIONES.....	188
BIBLIOGRAFIA.....	192

LISTA DE ABREVIATURAS

ADNc:ADN complementario.

ADNnm:ADN matricial.

ADNr:ADN ribosómico.

ADNsc:ADN del esqueleto cromosómico.

ARNhn:ARN heterogéneo.

ARNm:ARN mensajero.

ARNpre-r:ARN pre-ribosómico.

ARNr:ARN ribosómico.

ARNsn:ARN de pequeño tamaño, implicado en la maduración de los productos génicos.

BSA:Seroalbumina bovina.

DAPI:4'-6-diamidino-2-fenilindol.

DIPI:4'-6-bis(2'-imidazolinil-4H,5H)-2-fenilindol.

DPC:dietil-pirocarbonato.

DTT:ditio-treitol.

EDTA:ácido etilen-diamino tetraacético.

EGTA:ácido etilenglicol-bis (éter β -aminoetil) N' , N' tetraacético.

F.I.:Filamento intermedio.

G.I.:Gránulo intercromatínico.

IgM:Inmunoglobulina de la clase M.

LIS:diiodo-salicilato de litio.

M.E.:Microscopía electrónica.

β -Me: β -Mercaptoetanol.

PBS:tampón fosfato.

PFA:paraformaldehido

P.I.:punto isoelectrico

P.m.:peso molecular

PMSF:fluoruro de fenil metilsulfonilo.

poly A:cola terminal, común a los transcritos génicos del ARNhn, formada por 200-250 nucleótidos de Adenina.

RNP:partícula ribonucleoproteíca.

RNPhn:partícula ribonucleoproteíca que contiene ARN heterogéneo.

RNPr:partícula ribonucleoproteíca que contiene ARN ribosómico.

RNPsn:partícula ribonucleoproteíca que contiene ARNsn.

SDS:Dodecil sulfato sódico.

SDS-PAGE:Electroforesis en geles de acrilamida-bis SDS

TEMED:Tetrametil-etilendiamino

TTNa:Tetracionato sódico.

U1 ARNsn:ARN de pequeño tamaño, implicado en la maduración del ARN heterogéneo.

U3 ARNsn:ARN de pequeño tamaño implicado en la maduración del ARN pre-r.

U1RNP:partícula ribonucleoproteíca que contiene U1 ARN.

RESUMEN

La matriz nuclear es una estructura núcleoesquelética ampliamente estudiada en sistemas animales, pero apenas existen trabajos que aborden el tema en sistemas vegetales, que poseen diferencias acusadas en la organización del citoesqueleto respecto a las células animales.

Para profundizar en el conocimiento sobre el nucleoesqueleto y la matriz nuclear de plantas, hemos realizado un análisis de su organización ultraestructural, composición polipeptídica y localización de ácidos nucleicos residuales, en matrices nucleares de *Allium cepa* obtenidas por diferentes métodos de extracción.

El estudio realizado, nos ha permitido conocer las notables analogías ultraestructurales y funcionales que presenta la matriz de *Allium cepa* en relación con la de células animales, aunque su composición química se asemeja más a la de eucariotas inferiores y sus elementos internos parecen ser estables frente a procedimientos extractivos que resultan drásticos en algunos tipos celulares animales.

Su organización ultraestructural es eminentemente fibrilar. La lámina está constituida por una capa fibrilar continua con poros complejos asociados. La matriz nucleolar es también fibrilar con centros fibrilares residuales. La matriz interna presenta dos mallas fibrilares de diferente organización estructural y contraste a los electrones, una de las cuales presenta gránulos de RNP y gránulos intercromatínicos asociados. La organización de la matriz nuclear está mantenida básicamente por proteínas situadas en el rango 63-50 KD, a las que se asocian, dependiendo del procedimiento experimental

usado, distintas proteínas nucleares. El mantenimiento de su estructura organizada parece depender de los cationes divalentes.

Los componentes matriciales derivan de estructuras preexistentes en el núcleo "in situ" y empiezan a revelarse después de las digestiones enzimáticas con DNasa I y RNasa A.

La matriz interna procede principalmente de estructuras fibrilo-granulares de las regiones intercromatínicas; la matriz nucleolar está relacionada con los centros fibrilares y el componente fibrilar denso del nucleolo y la lámina proviene de elementos residuales de la envuelta nuclear.

Los componentes de la matriz nuclear mantienen una configuración espacial ordenada, presentando una alta conservación de la distribución intranuclear de los mismos.

La matriz nuclear es de composición heterogénea aunque mayoritariamente proteica, conteniendo proteínas en el rango 70-12 KD algunas de ellas altamente fosforiladas, y también remanentes de ácidos nucleicos. La detección de estos componentes en la matriz nuclear de *Allium cepa*, permite una interpretación funcional de esta estructura concordante con la establecida para la matriz nuclear en sistemas animales y posibilita correlaciones entre la matriz nuclear y componentes nucleares "in situ".

La presencia de ADN matricial y componentes ribonucleoproteicos resistentes a sal, detectados mediante un anticuerpo monoclonal anti-ADN y tinción EDTA respectivamente, indica que los dominios de cromatina y los dominios

ribonucleoproteicos son característicos de la matriz nuclear tanto en sistemas animales como vegetales. Estos dominios de cromatina y ribonucleoproteicos constituyen la expresión estructural de las funciones asociadas a la matriz nuclear.

Las proteínas fosforiladas se detectan mediante tinción con oxinitrato de bismuto, en los G.I. de la matriz interna y en la matriz nucleolar. Estos gránulos son estructuras universales del núcleo y componentes característicos de la matriz nuclear de sistemas animales. La tinción nucleolar es atribuida a la proteína homóloga a la nucleolina en células vegetales, que es una proteína nucleolar estructural y multifuncional, y está implicada en la transcripción y procesamiento de los genes ribosómicos, habiéndose localizado en la matriz nucleolar de algunos tipos celulares animales. La presencia de una proteína homóloga a la nucleolina en *Allium cepa*, es coherente con el papel atribuido a la matriz en la transcripción y procesamiento de los productos génicos.

La sensibilidad de la matriz interna frente al procedimiento extractivo es un tema de naturaleza controvertida, existiendo resultados aparentemente contradictorios que pueden explicarse si existieran diferencias en la composición polipeptídica de la matriz nuclear dependiendo del tipo celular.

La matriz nuclear de *Allium cepa* necesita cationes divalentes para mantener su morfología estructurada y es sensible sólo en parte a la estabilización por ARN. La extracción directa con 2M ClNa no agrega ni produce desorden en los elementos internos y los puentes disulfuro entre proteínas no parecen imprescindibles para su estabilización. Nuestros resultados sugieren que existe un grupo mínimo de proteínas matriciales que mantiene básicamente la organización estructural de la matriz y son

estables frente a las variaciones del método extractivo.

La matriz nuclear de *Allium cepa* presenta una organización estructural y composición polipeptídica notablemente similar a la de células animales, dominios diferenciados de cromatina y ribonucleoproteicos, gránulos intercromatínicos y una proteína homóloga a la nucleolina en la matriz nucleolar. Todos estos datos presentan un conjunto coherente que apoya la hipótesis de que la matriz nuclear es análoga estructural y funcionalmente en células animales y vegetales.

INTRODUCCION

Los primeros indicios de la existencia de una estructura altamente organizada en el núcleo celular, distinta de la cromatina y el nucleolo se obtuvieron en los años cuarenta. Los estudios de Mayer y Gulick en 1942, descubrieron la existencia de una clase de proteínas que resiste la extracción en medios de alta fuerza iónica. Posteriormente otros autores sugirieron que estas proteínas residuales forman un entramado estructural de fibrillas reconocibles dentro del núcleo, de carácter no exclusivamente proteínico sino ribonucleoproteínico (Zbarsky y Debov 1948, Anderson 1953, Du Praw 1956, Georgiev y Chentsov 1960, Steel y Busch 1963, Smetana y col. 1963, Narayan y col. 1967).

Mirski y Riss (1951), intentaron aislar este posible entramado estructural, eliminando conjuntamente de los núcleos, el ADN por medio de digestiones con nucleasas y las proteínas solubles en tampón de alta salinidad, obteniendo agregados de carácter básicamente proteico. Pero fue en 1973, cuando Berezney y Coffey desarrollaron por primera vez un método secuencial para aislar "matrices nucleares".

La "matriz nuclear" es un concepto operativo y se define como la subestructura nuclear residual que se obtiene después de someter núcleos interfásicos a extracciones sucesivas con detergentes no iónicos, soluciones de baja y alta fuerza iónica y altas concentraciones de nucleasas exógenas (Berezney y Coffey 1974, Comings y Okada 1976, Wanka y col. 1977, Kuzmina y col. 1981).

Se han utilizado una gran variedad de métodos para la preparación de subestructuras nucleares de las que se obtienen diferentes fracciones subnucleares

relacionadas con la matriz nuclear: fantasma nuclear (Riley y col. 1975), nucleoide (Cook y Brazell 1976), fracción lámina-poros (Aaronson y Blobel 1975, Dwyer y Blobel 1976), malla de RNP (Faiferman y Pogo 1975), esqueleto nuclear (Cook y col. 1976). Estas estructuras difieren entre si en composición y organización estructural y no son directamente homologables. Para aclarar conceptos pasaremos a definir cada una de ellas.

Fantasma nuclear: Subestructura nuclear residual obtenida de núcleos aislados por tratamientos sucesivos en 0,5 y 1 M Cl_2 Mg (Riley y col. 1975, Riley y Keller 1976). Morfológicamente está formado por la envuelta nuclear y componentes de matriz nuclear (Schröder y col. 1989).

Esqueleto nuclear: Subestructura nuclear obtenida después de extracciones sucesivas de núcleos aislados en 0,5-1 M ClNa , DNasa y detergentes (Wolfe 1980). La ausencia de digestión con RNasa permite recuperar un porcentaje significativo de ARN en estas fracciones y estudiar las características de unión de esta molécula al nucleoesqueleto (van Eekelen y van Venrooij 1981).

Nucleoides: Células o núcleos lisados en detergentes y extraídos en soluciones de alta salinidad o con polianiones (sulfato dextrano o heparina) (Adolph 1980). Estas estructuras conservan intacto el ADN. La extracción de histonas con polianiones o con soluciones de alta salinidad permite estudiar la asociación biológica del ADN que se encuentra desplegado debido a la deshistonización (Vogelstein y col. 1980).

Malla de RNP: Malla ribonucleoproteica obtenida extrayendo nucleos aislados con soluciones de alta salinidad (0,8 M ClNa) y digestión posterior con DNasa (Narayan y col. 1967); o bien por ruptura de núcleos en célula de Presión Francesa o en bomba de cavitación de nitrógeno (Faiferman y Pogo 1975).

Complejo lámina-poros: Obtenido a partir de la envuelta nuclear aislada, por tratamiento con Tritón X-100; difiere de ella por la ausencia de elementos membranosos

(Dwyer y Blobel 1976).

Matriz nuclear: Estructura nuclear residual obtenida de núcleos aislados por tratamientos sucesivos en detergentes no-iónicos, soluciones de baja fuerza iónica, extracción en alta fuerza iónica (1-2 M ClNa) y digestión con altas concentraciones de DNasa y RNasa. (Berezney y Coffey 1974, Comings y Okada 1976, Kuzmina y col. 1981). En 1976, Berezney y Coffey proponen que la matriz nuclear es una estructura básica para mantener la forma del núcleo y regular su funcionamiento. Desde entonces se ha ido abriendo camino, el modelo de un núcleo celular organizado por una estructura esquelética interna: LA MATRIZ NUCLEAR.

1. ULTRAESTRUCTURA DE LA MATRIZ NUCLEAR

Independientemente de los métodos de extracción utilizados, las matrices nucleares poseen tres componentes estructurales muy constantes; el complejo lámina-poros, el nucleolo residual y la matriz interna.

El complejo lámina-poros es el elemento residual de la envuelta nuclear. Está formado por un entramado de filamentos ortogonales de laminas, al que se encuentran asociados los poros complejos (Berezney y Coffey 1977, Aaronson y Blobel 1974, Aebi y col. 1986, Krohne y Benavente 1986). Presenta continuidad con la matriz nuclear interna y el citoesqueleto de filamentos intermedios (Carmo-Fonseca y col. 1987, Capco y col. 1982).

El nucleolo residual es la estructura resultante de la extracción del nucleolo (Jordan 1984). Muestra una estructura fibrilar muy compacta (Berezney y Coffey 1974, 1976, Bourgeois y col. 1987), altamente sensible a la presencia de cationes divalentes en el

medio de aislamiento (Bouvier y col. 1980, 1982, Bourgeois y col. 1987) y a la digestión con RNasa (Bouvier y col. 1985).

La matriz interna es el entramado fibrillogranular que conecta la lámina periférica con los nucleolos residuales (Berezney y Coffey 1977, Barrack y Coffey 1982), topográficamente parece corresponder con las regiones intercromatínicas del núcleo y un razonable cuerpo de evidencia indica que está formada en gran parte por ribonucleoproteínas (van Eekelen y col. 1981, Gallinaro y col. 1983, Verheijen y col. 1986).

Los datos obtenidos con la reconstrucción tridimensional de cortes seriados de matrices (Bouvier y col. 1980, 1984), los estudios de imágenes de matrices nucleares enteras (Capco y col. 1982, 1984) y los realizados en preparaciones de matrices nucleares incluídas a las que posteriormente se les elimina la resina (Fey y col. 1986), permiten establecer que la matriz nuclear retiene una configuración espacial muy ordenada de sus componentes. Esta configuración espacial de la matriz nuclear es muy importante en el mantenimiento de la compartimentalización funcional del núcleo, mantenida por esta estructura, que forma un nucleoesqueleto en continuidad con el citoesqueleto (Capco y col. 1982, Carmo-Fonseca y col. 1987), responsable, por su parte, de la compartimentalización citoplásmica de la célula (Lazarides 1980).

2. COMPOSICION QUIMICA DE LA MATRIZ NUCLEAR

La composición química global de las matrices nucleares es predominantemente proteica (92.3-97.6 %) con pequeños porcentajes pero significativamente reproducibles de fosfolípidos (1.5-6.9 %), ARN (0.05-1.2 %), y ADN (0.1-1.2 %) (Berezney y Coffey

1977, Berezney 1984), Verheijen y col. 1988).

2.1 COMPOSICION POLIPEPTIDICA DE LA MATRIZ NUCLEAR

Las proteínas de la matriz son fundamentalmente no histónicas, con Pms que varían desde 15 a 200 KD y con un perfil electroforético en geles bidimensionales muy complejo, presentando diferencias, dependiendo del tipo celular y del procedimiento de extracción utilizado (Kauffman y col.1981, Berezney 1984, Verheijen y col. 1988).

En mamíferos y aves las principales proteínas se detectan en el rango 45-75 KD (Berezney y Coffey 1974, Verheijen y col. 1988, Kauffman y Shaper 1984, Peters y Comings 1980, Maundrell y col.1981). Sin embargo, en eucariotas inferiores predominan las proteínas de bajo Pm, entre 14-28 KD en *Tetrahymena piriformis* (Herland y Wunderlich 1976) y 23-36 KD en *Physarum policephalum* (Mitchelson y col. 1979). En vegetales, aunque se dispone de pocos datos se han descrito proteínas matriciales mayoritarias con Pms comprendidos entre 55 y 63 KD en *Allium cepa* (Ghosh y Dey 1986).

De acuerdo con sus Pms podríamos clasificarlas en 3 grupos:

PROTEINAS EN EL RANGO 30-45 KD

Entre ellas destacan, los componentes proteicos principales de los complejos de RNPhn (Gallinaro y col. 1983), la actina nuclear (Nakayasu y Ueda 1985, Capco y col. 1982, Verheijen y col.1986) y algunas proteínas matriciales nucleolares (Berezney y Coffey 1977, Comings y Peters 1981).

PROTEINAS EN EL RANGO 60-80 KD

Entre estos Pms se encuentran las laminas de la periferia nuclear (Krohne y Benavente 1986) y otros polipéptidos localizados en la matriz interna, como son las proteínas que se asocian al ADN (Razin y col. 1981, Bodnar y col. 1983); la proteína de 70 KD del U1 ARNsn (Verheijen y col.1986) y la proteína de 73 KD de unión a poly A (Maundrell y col. 1981, Bouvier y col. 1984).

PROTEINAS DE PM SUPERIOR A 80 KD

Mencionaremos dentro de este grupo: la proteína de 145 KD localizada en matrices nucleolares de nucleolos amplificados de *Xenopus laevis* (Benavente y col. 1984); la glicoproteína de 174 KD del poro complejo detectada por Gerace y col. (1982) en envueltas nucleares de hígado de rata; la topoisomerasa II (Berrios y col.1985) y la proteína C23 o nucleolina de 110 KD (Long y Ochs 1983) implicada en la transcripción del ARNpre-r y en el ensamblaje de los ribosomas (Bugler y col. 1982).

A pesar de la variabilidad observada, existen 2 características que definen los perfiles polipeptídicos de la matriz nuclear: la presencia de laminas y una ausencia notable de histonas.

2.1.1 COMPOSICION POLIPEPTIDICA DE LA FRACCION LAMINA-POROS

Los principales componentes de esta fracción son las laminas y las proteínas residuales de los poros complejos.

Las proteínas mayoritarias y mejor caracterizadas de esta fracción son las laminas, de las cuales existe abundante información acerca de su estructura y función en el núcleo celular.

Se han identificado 3 laminas en mamíferos y aves, a las que se les designa como laminas A, B y C en mamíferos (Gerace y col.1978, Krohne y col.1984, McKeon y col.1983) y A, B1 y B2 en aves (Shelton e Eagle 1979, Stick y Hausen 1980); 4 en anfibios (*Xenopus laevis*) denominadas LI, LII, LIII, LIV (Benavente y col. 1985); una en la vesícula germinal del molusco *Spisula* (Maul y col. 1984) y 2 en drosófila (Dm1 y Dm2) (Krohne y Benavente 1986).

Poseen diferencias en sus puntos isoeléctricos, de manera que se pueden establecer dos grupos basados en este criterio: laminas neutras, con un P.I. casi neutro son las laminas A y C de mamíferos y aves, LII, LIII y LIV de anfibios; y las laminas ácidas con un P.I. de 5.6 o más bajo como la lamina B de mamíferos y aves y la LI de anfibios (Krohne y Benavente 1986).

Las laminas representan una familia de polipéptidos con una gran relación estructural e inmunológica entre sí (Höger y col. 1988, McKeon 1986). Están relacionadas también muy estrechamente con los filamentos intermedios, de tal forma que se consideran como una clase de éstos últimos (Stick 1988, Franke 1987).

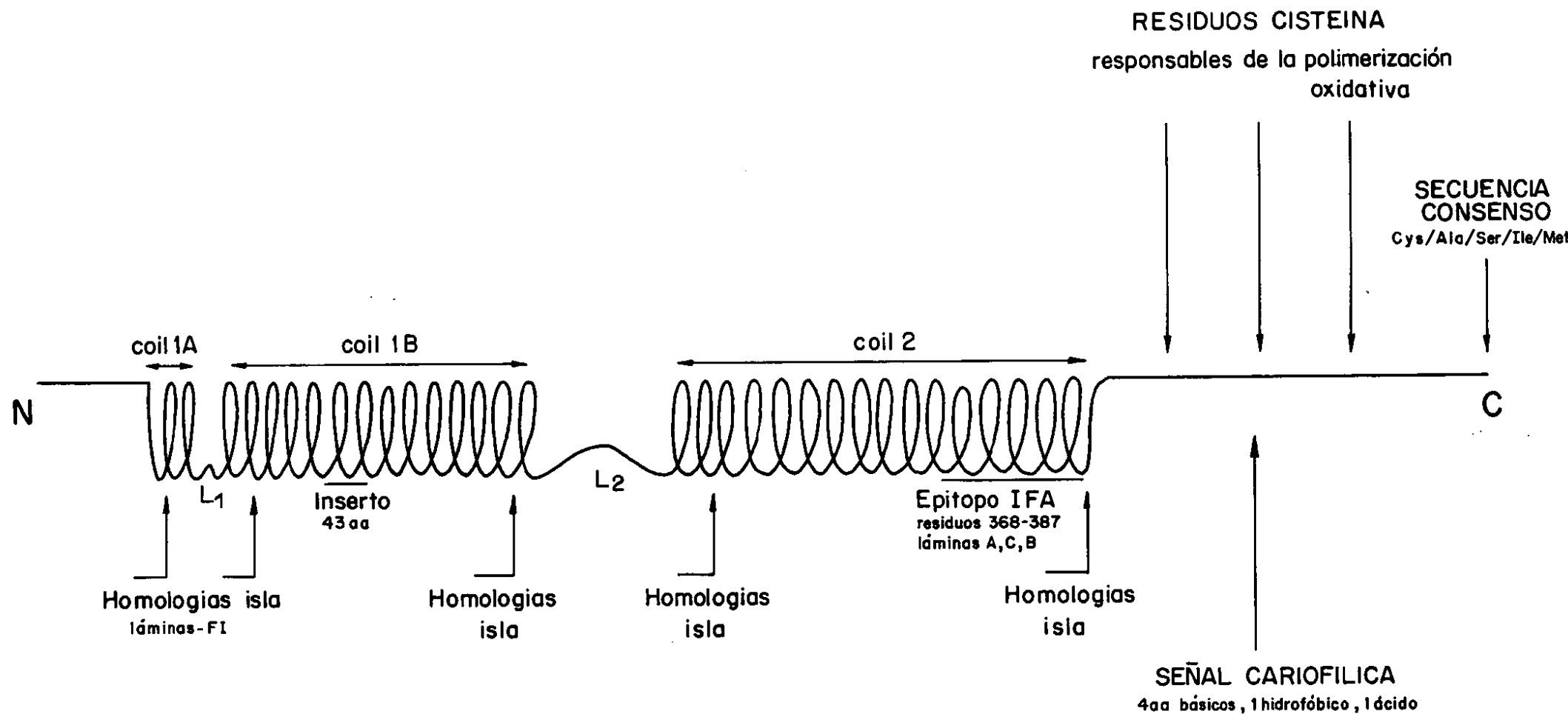
ESTRUCTURA MOLECULAR DE LAS LAMINAS

Las laminas y los F.I. comparten la misma organización general a nivel molecular, que consiste en un dominio central de α -hélice de aproximadamente 360 aminoácidos, interrumpido por 2 fragmentos no helicoidales y flanqueado por una cabeza en el extremo amino-terminal y una cola en el carboxílico que no presentan estructura de α -hélice (ESQUEMA 1). (Aebi y col. 1986, Franke 1987, McKeon y col. 1986).

El dominio α -hélice está formado por heptapéptidos repetitivos típicos de las ordenaciones "coiled-coils" de los F.I. en los que el primer y cuarto aminoácido contienen restos hidrofóbicos. Este dominio presenta interrupciones intercalares que dividen a la α -hélice en tres regiones: coil 1A-1B y coil 2 semejantes a las de los F.I. El coil 1B de la α -hélice tiene una inserción de 43 aminoácidos en una zona donde todos los F.I. no neuronales tienen un intron muy conservado (McKeon y col. 1986, Franke 1987, Fisher y col. 1986). Esta estructura central está muy conservada en todas las laminas, sin embargo las cabezas y las colas son muy variables (Stick 1988, McKeon y col. 1986).

La cabeza de las laminas es relativamente corta (326 aa), poco conspicua y muestra un enriquecimiento general en serina y treonina (Franke 1987, McKeon y col. 1986).

Los extremos carboxílicos o colas son también ricos en aminoácidos básicos y presentan varias características interesantes. LLevan una señal carioflica de reconocimiento y localización nuclear, responsable de la acumulación nuclear de estas proteínas (Franke 1987, Höger y col. 1988), tetrapéptidos de glicina semejantes a los de las queratinas (McKeon y col. 1986), la secuencia consenso presente en todas las laminas



ESQUEMA 1

excepto la lamina C y los únicos residuos de cisteína de estas proteínas responsables de la polimerización oxidativa en distintos oligómeros (McKeon y col. 1986, Stick 1988).

Las secuencias de aminoácidos de las laminas A, C y B humanas han sido deducidas a partir de clones de ADNc (McKeon y col. 1986, Höger y col. 1988). Las laminas A, C son proteínas idénticas en secuencia excepto por la presencia de 133 aminoácidos adicionales en el extremo carboxílico de la lamina A (McKeon y col. 1986). Ambas laminas probablemente se producen como consecuencia de un procesamiento alternativo del mismo ARNhn (McKeon y col. 1986, Fisher y col. 1986).

La microscopía electrónica evidencia también la relación estructural existente entre las laminas y los F.I.. Ambos tipos de polipéptidos poseen una organización característica en forma de bastón de aproximadamente 50 nm de longitud en el que se puede distinguir una cola con 1 ó 2 cabezas globulares en su extremo. Tienen un diámetro de 10 nm, aunque presentan diferencias en el número de cabezas y en la longitud de la cola (Aebi y col. 1986).

Las laminas y los F.I. también están relacionados inmunológicamente. El anticuerpo monoclonal IFA de ratón obtenido por Pruss y col. (1981) que reconoce a todas las clases de F.I., también reconoce a las laminas (Osborn y Weber 1987, Lebel y Raymond 1987). El epitopo IFA se extiende entre los residuos 369-387 del extremo carboxílico del coil 2 en las laminas A, C (Geisler y col. 1983), esta zona en los F.I. presenta una secuencia consenso que se considera importante para la interacción de las unidades "coiled-coil" en el filamento (Geisler y Weber 1982).

CLASIFICACION DE LAS LAMINAS

Teniendo en cuenta las características bioquímicas, estructura molecular, características fisiológicas, su comportamiento durante la mitosis y su expresión diferencial durante el desarrollo embrionario, es posible clasificar a las laminas en tres grupos (TABLA I) (Stick 1988):

LAMINAS TIPO A

Pertenecen a este grupo, las laminas A y C humanas, LII, LIV de anfibios y tal vez la B2 de aves (Newport y Forbes 1987). Se caracterizan por permanecer solubles en el citoplasma durante la mitosis (Stick y col. 1988), poseer un bloque de oligohistidina en la región de la cola (Wolin y col. 1987) y ser expresadas en bajos niveles durante el desarrollo temprano aumentando su nivel en el curso de la diferenciación celular (Stewart y Burke 1987).

LAMINAS TIPO B

Pertenecerían a este grupo, la lamina B humana, la B1 de aves y la LI de anfibios (Newport y Forbes 1987). Se caracterizan por permanecer asociadas con vesículas de membrana cuando la lámina se desensambla durante la mitosis (Stick y col. 1988), poseer un residuo de cisteína en el coil IB que falta en las de tipo A (Krohne y col. 1987) y ser las únicas constitutivas (Paulin-Levasseur y col. 1988) capaces de formar la lámina como un homopolímero.

LAMINAS NO A-NO B

La lamina III de *Xenopus laevis*, tiene características de los dos tipos anteriores, le falta el bloque de oligohistidina propio del tipo A, y el residuo cisteína típico de las laminas tipo B (Stick 1988), permanece soluble en el citoplasma durante la mitosis (Benavente y col. 1985, Stick 1987) y es expresada constitutivamente (Krohne y col.1981, Stick y Hausen 1985).

Las laminas se ensamblan poliméricamente "in vivo" formando una malla de filamentos ortogonales de 10 nm de diámetro que constituye la lámina, situada entre la cromatina periférica y la membrana interna de la envuelta nuclear (Gerace y Burke 1988, Aebi y col. 1986). La lamina B parece ser responsable del anclaje de la lámina a la membrana nuclear interna (Burke y Gerace 1986) y del ensamblaje con el citoesqueleto al copolimerizar con la vimentina (Georgatos y Blobel 1987).

EXPRESION DIFERENCIAL DE LAS LAMINAS

Existe una expresión diferencial y programada de las laminas durante los procesos de diferenciación y desarrollo embrionario. Dentro de una misma especie se detecta variabilidad durante el desarrollo embrionario y especificidad de tipo celular, existiendo también variación interespecífica (Lourim y Lin 1989, Smith y Fisher 1989, Benavente y Krohne 1985, Stick y Hausen 1985).

PROTEINAS RESIDUALES DE LOS POROS COMPLEJOS

Se conocen 8 glicoproteínas constituyentes de los poros complejos (Snow y col. 1987), y todas ellas contienen residuos múltiples N-acetilglucosamina unidos glicosídicamente (Holt y col. 1987). De todas ellas la más claramente identificada como matricial es la GP190 (TABLA 1) (Berrios y col. 1983). Esta proteína parece ser la responsable del anclaje del poro a las membranas nucleares (Agutter 1988), posiblemente a través de su parte glucídica (Gerace y col. 1982).

2.1.2. COMPOSICION POLIPEPTIDICA DE LA MATRIZ NUCLEOLAR

La matriz nucleolar puede conseguirse libre de los otros componentes matriciales, sometiendo nucleolos aislados a las mismas extracciones sucesivas que se realizan para la obtención de matrices nucleares. La composición química global de esta fracción es semejante a la de la matriz nuclear interfásica (Berezney 1984) pero su perfil electroforético es distinto del perfil de la matriz nuclear total, del de la lámina y del de la matriz interna (Berezney 1984, Verheijen y col. 1988).

En los sistemas estudiados, es la única fracción de la matriz nuclear que no está enriquecida en polipéptidos en el rango 60-70 KD (Berezney y Coffey 1976), estándolo sin embargo en el intervalo 30-60 KD y presenta numerosas proteínas básicas (Comings y Peter 1981).

Se han detectado inmunológicamente varias proteínas de la matriz nucleolar, cuyas características y funciones se enumeran en la tabla II. Entre ellas citaremos, la proteína de 145 KD localizada en los filamentos que forman la estructura mayoritaria del

TABLA 1

PROTEINAS DE LA FRACCION LAMINA-POROS

PROTEINA	P.M.	P.I.	TIPO CELULAR	FUNCION
Lamina A	70-74 KD	6.8-7.2	hígado de rata	-núcleo esquelética en la lámina. -silenciador transcripcional?.
Lamina A	71-75 KD	6.8-7.2	eritrocitos de pollo	idem
Lamina C	60-62 KD	6.8-7.2	hígado de rata	-núcleo esquelética en la lámina. -silenciador transcripcional?.
Lamina C (B2)	68 KD	6.8-7.2	eritrocitos de pollo	idem
LII	60-68 KD	6.2-6.35	tejidos adultos de Xenopus l.	-núcleo esquelética en la lámina.
LIV	75 KD	7	estadios tardíos de espermatogénesis de Xenopus l.	idem
Lamina B62-72	KD	5.6	hígado de rata	-núcleo esquelética en la lámina. -Anclaje lámina-membrana nuclear interna. -Asociación lámina-citoesqueleto.
Lamina B (B1)	67-71 KD	5.6	eritrocitos de pollo	idem
LI	72-75 KD	5.35	tejidos adultos de Xenopus l.	idem
LIII	60-68 KD	6.4-6.6	neuronas, miocitos, oocitos, y células de Sertoli Xenopus l.	-núcleo esquelética en la lámina.

TABLA 1 (cont.)

PROTEINAS DE LA FRACCION LAMINA-POROS

PROTEINA	P.M.	P.I.	TIPO CELULAR	FUNCION
Lclam	67 KD	6.3	oocitos de Spísula s.	-nucleoesquetica en la lámina.
Dm1	74 KD	6	embriones tempranos y tardíos de Drosophila melanogaster	ídem
Dm2	76 KD	6	embriones tardíos de Drosophila melanogaster	ídem
GP 190	188-190 KD	-	embriones de Drosophila melanogaster	-Anclaje del poro a las membranas nucleares.

esqueleto nucleolar en nucleolos amplificados de *Xenopus laevis* (Franke y col. 1981, Moreno Diaz de la Espina y col. 1982b, Benavente y col. 1984); la nucleolina (C23) (Long y Ochs 1983) fosfoproteína de 110 KD implicada en la transcripción del ARNr y en el ensamblaje de los ribosomas (Bugler y col. 1982); la numatrina (B23) fosfoproteína nucleolar de 40 KD que se localiza en el componente granular del nucleolo en interfase (Spector y col. 1984) y está asociada con la inducción de la síntesis del ADN en células activadas para la mitosis (Feuerstein 1988); y la Ki67 que es un antígeno nuclear de células proliferantes localizado predominantemente en el cortex nucleolar y en el componente fibrilar denso (Verheijen y col. 1988), sufre redistribución mitótica apareciendo en el nucleoplasma durante profase y rodeando a los cromosomas condensados en metafase (Verheijen y col. 1989).

2.1.3 COMPOSICION POLIPEPTIDICA DE LA MATRIZ INTERNA

Las proteínas de la matriz interna (TABLA III) presentan un amplio rango de Pms (40-260 KD) y P.I.(5.5-8.5) (Berezney y col. 1989, Nakayasu y col. 1989), con un enriquecimiento en polipéptidos de 60-70 KD de P.I. más básicos que las laminas (Berezney 1984). Parecen ser muy distintas en secuencia unas de otras y a su vez de las laminas (Berezney y col. 1989); posiblemente no estén relacionadas con los F.I. ya que ninguna de ellas es reconocida por el anticuerpo IFA que es universal contra F.I.

Es difícil definir con precisión la composición polipeptídica de este componente matricial pues es muy sensible a las variaciones en los procedimientos de extracción utilizados (Kauffman y col. 1981, Kauffman y Shaper 1984). La oxidación de grupos sulfhidrilo (Kauffman y col. 1981, Poznanovic y Sevaljevick 1986), el uso de inhibidores de proteolisis (Berezney 1979, Shaper y col. 1979), un aumento en la fuerza iónica

TABLA II

PROTEINAS DEL ESQUELETO NUCLEOLAR

PROTEINA	P.M.	P.I	TIPO CELULAR	FUNCION
p145	145 KD	6.15	tejidos adultos y oocitos de Xenopus l.	-almacenaje y transporte de partículas prerribosómicas.
nucleolina (C23)	110 KD	5.5	células CHO	-transcripción de ARNr y ensamblaje de ribosomas.
numatrina (B23)	40 KD	5	linfocitos B de ratón.	-regulación de mitogénesis celular.
Antígeno Ki67	-	-	células proliferantes	- humanas.

(Verheijen y col. 1986), el orden de los pasos en la secuencia de las extracciones (Kauffman y col. 1981, Bouvier y col. 1984) y la presencia o ausencia de cationes divalentes en el medio de extracción (Bouvier y col.1985, Bourgeois y col. 1987, Lebkowski y Laemmli 1982) son factores que afectan a la cantidad del material intranuclear que se recupera (Kauffman y col. 1981, Bouvier y col.1985, Bourgeois y col.1987), a su composición polipeptídica (Bouvier y col. 1985, Kauffman y col. 1981, Berezney 1984, Verheijen y col. 1986) y a su organización estructural (Bouvier y col. 1985, Bourgeois y col. 1987).

El uso de agentes inductores de oxidación de grupos sulfhidrilo conduce a la aparición en los perfiles polipeptídicos de un amplio número de polipéptidos de pesos moleculares superiores a 80 KD si se emplea TTNa (Kauffman y col. 1981, Berezney 1984), o al enriquecimiento en algunas proteínas que podrían pertenecer al grupo A de las proteínas constituyentes de las monopartículas 40S si se emplea O-Fenantrolina-Cu, sugiriendo en este último caso que la unión de los informóferos a la matriz podría estabilizarse via puentes disulfuro (Poznanovic y Sevaljevick 1986).

El empleo de inhibidores de proteolisis (Berezney 1979, Kauffman y col. 1981, Shaper y col. 1979) y el aumento de la fuerza iónica (Verheijen y col. 1986) producen variaciones cuantitativas en los perfiles polipeptídicos: la incorporación de PMSF en los tampones de extracción hace recuperar un porcentaje significativamente superior de proteínas matriciales (Berezney 1979, Kauffman y col. 1981, Shaper y col. 1979), y un aumento de la fuerza iónica (ClNa en lugar de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$) produce un aumento en el porcentaje de proteínas extraídas (Verheijen y col. 1986).

Los cationes divalentes parecen estabilizar el componente ribonucleoproteico de la

matriz interna, que se hace resistente a la extracción en 2M ClNa cuando la digestión con RNasa se realiza en tampones que contienen Mg^{++} (Bouvier y col. 1985). La matriz interna, se enriquece, en este caso, en 2 proteínas de 49 KD y 70 KD (Bouvier y col. 1985).

Se han identificado numerosas proteínas como componentes de matriz interna (TABLA III): La actina en forma despolimerizada y ácida (P.I. 5.1) (Capco y col. 1982, Verheijen y col. 1986, Nakayasu y Ueda 1986) parece implicada en la transcripción (Schröder y col. 1982, Egly y col. 1984) y en la regulación del metabolismo de poly A mediado por poly A polimerasa (Schröder y col. 1982), y es, por ahora, la única proteína carioesquelética detectada en la matriz nuclear interna. Proteínas que ligan actina como la NAB de ACANTHAMOEBA que liga filamentos de actina de forma independiente de ATP, y también liga ADN (Rimm y Pollard 1989). Proteínas que ligan al ADN con Pms entre 60-70 KD, P.I. más básicos que las laminas y no relacionadas con ellas inmunocitoquímicamente (Noaillac-Depeyre y col. 1987). La proteína de 260 KD, semejante a la espectrina, probable componente de los lugares de anclaje de los lazos de ADN nuclear (Nakayasu y col. 1989). La proteína de 70 KD específica de U1 RNP (Habets y col. 1985); las proteínas de 43 KD y 41.5 KD asociadas al ARNhn (van Eekelen y van Venrooij 1981) y la proteína de 73KD de unión a poly A, estas tres últimas proteínas se consideran responsables de la unión del ARNhn a la matriz interna. (van Eekelen y van Venrooij 1981, Maundrell y col. 1981, Bouvier y col. 1984).

También se han encontrado asociadas con la matriz interna las principales enzimas responsables de la duplicación del ADN (ver TABLA IV), ADN polimerasa α (Smith y Berezney 1980), ADN primasa (Wood y Collings 1986b, Tubo y Berezney 1987a y b), topoisomerasa II (Berrios y col. 1985), topoisomerasa I (Nishizawa y col. 1984) y la

TABLA III

PROTEINAS DE LA MATRIZ INTERNA

PROTEINA	P.M.	P.I.	TIPO CELULAR	FUNCION
ACTINA	43 KD	6.1	oocitos de <i>Xenopus</i> células L51784 de ratón.	1.-Unión y libera- ción de ARNm en la matriz.
N A B (prot.nuclear que liga actina)	34 KD	-	<i>Acanthamoeba</i> c.	-liga actina y ADN a la matriz nuclear.
PROTEINA DE UNION a poly A	73 KD	9.4	eritroblastos de pato. células HeLa	-Unión del ARNhn a la matriz.
PROTEINA DE RNPhn (grupo C)	41.5 KD	6.7-7.4	células HeLa S3 hígado de rata	-Unión del ARNhn a la matriz.
PROTEINA DE RNPhn (grupo C)	43 KD	7.4-8.1	células HeLa S3 hígado de rata	-Unión del ARNhn a la matriz.
PROTEINA asociada a ARN U1	70 KD	-	HeLa S3 carcinoma escamoso de pulmón, fibroblastos, células BHK	-Unión de partículas RNP U1 a la matriz.
PROTEINA de unión a ADN	260 KD	-	hígado de rata	-Componente de los lugares de anclaje de los lazos de ADN a la matriz.

TABLA IV

ACTIVIDADES ENZIMATICAS DETECTADAS EN MATRIZ INTERNA

ACTIVIDAD	ENZIMA UNIDA A MATRIZ	TIPO CELULAR
Replicación del ADN	ADN polimerasa alfa	hígado de rata células CV-1 riñón de mono africano, fibroblastos.
Replicación del ADN	ADN primasa	células HeLa
Regulación de la expresión génica por medio de acetilación de ADN	ADN metilasa	células ascites Krebs 2 de ratón.
Síntesis de poly A de ARNhn	Polimerasa poly A	roedores
Transcripción de ARNhn	ARN polimerasa II	células HeLa S3
Desenrolle de la hélice de ADN (regulación de la densidad superhelicoidal de ADN)	Topoisomerasa II (sub.166-170 KD)	embriones de Drosófila m. linfoblastoides de pollo (células MSB-1)
Regulación de la densidad superhelicoidal de ADN.	Topoisomerasa I (sub.95 KD)	hígado de rata en regeneración

ADN metilasa (Burdon y col. 1985) implicada en su metilación, y por tanto en la regulación de la expresión génica (Burdon y col. 1985), y las principales enzimas catalizadoras de la transcripción del ARN, la ARN polimerasa II (Lewis y col. 1984) y poly A polimerasa (Schröder y col. 1984).

2.2. EL ADN MATRICIAL

La matriz contiene siempre un pequeño porcentaje (0.1-0.2 %) de ADN, altamente resistente a la digestión nucleásica y a la extracción salina, denominado ADN matricial (ADN_{nm}) (Berezney y Coffey 1975). Los resultados de los estudios de cinética de reasociación del ADN_{nm} son contradictorios y no han permitido establecer conclusiones sobre un enriquecimiento (Neuer y Werner 1985, Jacksson y col. 1984) o no (Pardoll y Vogelstein 1980, Chimera y Musich 1985) en secuencias repetitivas.

Tampoco ha sido posible identificar una secuencia única que fuera la responsable de la unión del ADN a la matriz (Pardoll y Vogelstein 1980) pero sí se han detectado secuencias de unión, conocidas con el nombre de SAR o MAR (Amati y Gasser 1988), en espaciadores no transcritos (Mirkotvich y col. 1984), orígenes de replicación (Amati y Gasser 1988), centrómeros (Amati y Gasser 1988) y adyacentes a regiones "enhancer" (Cockerill y Garrard 1986). Aunque no presentan fuerte homología de secuencia, comparten algunas características comunes: son similares en longitud y contenido en A/T (Newport y Forbes 1987), poseen secuencias consenso de ruptura por topoisomerasa II (Cockerill y Garrard 1986) y compiten, aunque pertenezcan a organismos filogenéticamente muy distanciados, por las mismas proteínas matriciales (Cockerill y Garrard 1986).

2.3. EL ARN DE LA MATRIZ NUCLEAR

La composición química global de las matrices nucleares evidencia también un pequeño porcentaje (0.05-1.2 %) de ARN en la matriz (Berezney y Coffey 1977).

El ARNhn y los ARNsn de pequeño tamaño implicados en la maduración génica se han aislado bioquímicamente y detectado inmunológicamente en fracciones de matriz nuclear (van Eekelen y van Venrooij 1981, van Eekelen y col. 1982, Maundrell y col. 1981, Ross y col.1982, Long y Schrier 1983).

Las moléculas de ARNhn se asocian a la matriz desde el principio de su transcripción (Jackson y col. 1981), detectandose un enriquecimiento de transcritos primarios de genes activos e intermedios de procesamiento en la matriz interna (Ross y col. 1982, Ciejek y col.1982, Maundrell y col. 1981) así como de ARNs pre-r en la matriz nucleolar (Ciejek y col. 1982). Estos productos génicos se han localizado en fibrillas ribonucleoproteicas que también contienen ARNsn en la matriz interna de esqueletos nucleares (Gallinaro y col. 1983) y tal vez constituyen la unidad básica del procesamiento del ARNhn (Gallinaro y col. 1983) pues se sabe que esta molécula permanece unida a la matriz durante su maduración (Agutter y Birchall 1979, van Eekelen y van Venrooig 1981) y solo es liberada después de la escisión del último intrón (Agutter 1988, Gruss y col. 1979).

Todos los ARNsn se han encontrado en la matriz (Gallinaro y col. 1983, Ciejek y col.1983), el U3 ARNsn está restringido al nucleolo (Parker y Steitz 1987) y los demás se sitúan en la matriz interna (Reuter y col. 1984, Verheijen y col. 1986, Smith y col.

1986).

La asociación a la matriz tanto de RNPs_n como de RNPs_h requiere filamentos de actina (Nakayasu y Ueda 1984) pero el tipo de unión de ambas moléculas probablemente sea distinto ya que se han podido eliminar diferencialmente de la matriz por tratamiento con 1% deoxicolato sódico (Pogo y col. 1982).

3. CORRESPONDENCIA "IN SITU" DE LA MATRIZ INTERFASICA

Aunque la existencia de una matriz nuclear "in situ" es aceptada actualmente por la gran mayoría de los grupos que trabajan en este campo, existen críticas acerca de su realidad "in vivo". Se ha aducido que el prolongado tratamiento para aislar matrices nucleares y en particular la extracción con alta salinidad (2M ClNa) promueven agregación y reordenamiento de componentes nucleares (Hadlacky y col. 1981, Wunderlich y col. 1983).

CORRESPONDENCIA "IN SITU" DE LA MATRIZ INTERNA

Este componente matricial es el más cuestionado (Kauffman y col.1981) ya que algunas proteínas intranucleares pueden unirse covalentemente y formar fibrillas artefactualmente por oxidación espontánea o inducida de grupos sulfhidrilo intermoleculares (Kauffman y col.1981) y también puede producirse unión covalente entre proteínas, posteriormente a la extracción, por fijación con glutaraldehído en los especímenes para M.E. (Bekers y col. 1986). La alta concentración salina induce colapso y agregación en regiones del nucleoplasma que contienen altas concentraciones de cromatina (Hadlacky y col. 1981, Burkholder 1983) y, también trazas de Ca^{++} pueden

agregar y precipitar componentes nucleares solubles (Lebkowski y Laemmli 1982, Comerford y col. 1985).

Sin embargo, la tinción regresiva de EDTA que permite identificar el componente RNP de la matriz interna indica que existe una buena correspondencia entre la malla matricial y los dominios RNP intercromatínicos del núcleo donde se produce la transcripción y replicación de la cromatina activa (Berezney 1984).

En esta misma línea, el uso de anticuerpos contra RNPs ha permitido la localización conjunta de RNPsn y RNPhn en la matriz interna al igual que sucede en los dominios intercromatínicos del núcleo "in situ" (Reuter y col. 1984, Verheijen y col. 1986, Smith y col. 1986).

Además, se han citado como componentes de esta estructura matricial "in situ": la actina nuclear (Nakayasu y Ueda 1985, Clark y Rosenbaum 1979), los gránulos intercromatínicos (Berezney y Coffey 1977, Smith y col. 1986, Turner y Franchi 1987), precentrómeros en matrices interfásicas (Cox y col. 1983) y complejos sinaptonémicos en matrices nucleares preparadas a partir de células en paquitene (Raveh y Ben-Ze'ev 1984). Aunque queda por dilucidar con respecto a la compleja estructuración fibrilogramular de la matriz interna qué proteínas forman parte integral de la malla y cuales se encuentran asociadas a ella por interacciones resistentes a alta fuerza iónica.

CORRESPONDENCIA "IN SITU" DE LA MATRIZ NUCLEOLAR

Es difícil establecer correspondencias entre la matriz nucleolar y el nucleolo "in situ" debido a la estructura altamente compacta que presenta este componente matricial

cuando se usan cationes divalentes en los tampones de aislamiento (Berezney 1984), o a la estructura fibrilar descondensada pero homogénea, sin centros fibrilares morfológicamente distinguibles, en los procedimientos que usan EDTA (Bouvier y col. 1980).

Sin embargo, el uso de anticuerpos contra proteínas nucleolares ha permitido salvar, en parte, esta dificultad (Benavente y col.1984, Feuerstein y col.1988). La nucleolina (Long y Ochs 1983), numatrina (Feuerstein y col. 1988) y la proteína de 145 KD de *Xenopus laevis* (Benavente y col. 1984) se detectan inmunocitoquímicamente en la matriz nucleolar y en el nucleolo "in situ". La nucleolina se encuentra asociada a los centros fibrilares, en el componente fibrilar denso y en el granular (Spector y col. 1984); la numatrina en el componente fibrilar denso y en el granular (Spector y col. 1984); y la proteína de 145 KD en el cortex nucleolar de nucleolos amplificados, en los cuerpos medusoides, cuerpos nucleoplásmicos y en la periferia nucleolar de células somáticas de la misma especie (Benavente y col. 1984) lo que permite suponer que la matriz nucleolar es una estructura continua que se extiende por todo el nucleolo en conexión con la matriz interna.

CORRESPONDENCIA "IN SITU" DE LA LAMINA RESIDUAL

Este componente es muy estable independientemente del procedimiento de extracción utilizado (Kauffman y col. 1981, Bouvier y col. 1985). Las laminas se detectan "in situ" en la periferia nuclear (Gerace y col. 1982), adosadas a la membrana interna de la envuelta nuclear, estando ausentes de los poros complejos y del interior del núcleo (Gerace y Blobel 1971).

4. EL ESQUELETO CROMOSOMICO

En analogía con el método de obtención de la matriz nuclear interfásica se pueden obtener estructuras esqueléticas de cromosomas en metafase sometiendo a digestión de su ADN y extracción posterior de proteínas con alta salinidad o con polianiones (Paulson y Laemmli 1977).

El esqueleto cromosómico refleja la forma del cromosoma, presenta una estructura continua que recorre el eje de cada cromátida unida por los cinetocoros residuales (Paulson y Laemmli 1977, Earnshaw y Laemmli 1983), es sensible a la quelación, y mantiene su organización probablemente por interacciones metaloprotéicas (Lewis y Laemmli 1982, Mirkovitch y col. 1984). Omitiendo la digestión con DNasa y realizando un extendido de los cromosomas se obtienen "nucleoides" metafásicos con todo el ADN desplegado (Paulson y Laemmli 1977). Esta molécula se organiza en lazos que emergen de la estructura axial cuya longitud media es semejante a la de los lazos de la matriz interfásica (Paulson y Laemmli 1977). Se supone, por tanto, que una estructura esquelética mantiene al ADN eucariótico con su configuración espacial en lazos durante todo el ciclo celular.

4.1 COMPOSICION QUIMICA DEL ESQUELETO CROMOSOMICO

Las principales proteínas son no histónicas con Pms comprendidos entre 48-170 KD (Lewis y Laemmli 1982, Earnshaw y Laemmli 1983, Jeppesen y Morten 1985). Dos de ellas son mayoritarias: SC2 (135 KD) y SC1 (170 KD) y están estabilizadas por cationes divalentes (Cu^{++} , Ca^{++} , Mg^{++}) (Lewis y Laemmli 1982). SC1 ha sido identificada como la topoisomerasa II y se encuentra en la base de los lazos de ADN

en cromosomas metafásicos (Earnshaw y col. 1985).

Las proteínas en el rango 48-71 KD son muy características en los perfiles electroforéticos, todavía no están bien caracterizadas pero resultan de interés porque sus Pms coinciden con algunas proteínas de la matriz interfásica (Plagens 1978, Pieck y col. 1985, Goodherham y Jeppesen 1983, Jeppesen y Morten 1985, Razin y col. 1981), entre ellas p52 y p60 son proteínas de unión al ADN y componentes de la estructura de asociación al ADN en la base de los lazos (Razin y col. 1981). Pertenecen también al esqueleto cromosómico dos proteínas del cinetocoro de 77 KD y 110 KD que han sido localizadas inmunológicamente (Earnshaw y col. 1984).

4.2. EL ADN DEL ESQUELETO CROMOSOMICO

En similitud con la matriz nuclear interfásica también existe un ADN residual asociado al esqueleto cromosómico (ADNsc) (Razin y col. 1981, van der Velden y col. 1984) unido por sus orígenes de replicación (van der Velden y col. 1984). Estos lugares de unión del ADN son comunes a la matriz interfásica y al esqueleto cromosómico y aparecen conservados durante todo el ciclo celular.

4.3. RELACION MATRIZ NUCLEAR-ESQUELETO CROMOSOMICO

El mantenimiento durante todo el ciclo celular de la configuración espacial del ADN en forma de lazos (Paulson y Laemmli 1977), de algunas proteínas constituyentes de la base de los lazos (p52, p60, topoisomerasa II) (Razin y col. 1981, Earnshaw y col. 1984, 1985) y de los orígenes de replicación como lugares de unión ADN-esqueleto (van der Velden y col. 1984) hacen suponer que el esqueleto cromosómico se origina

por una reorganización de partes de la matriz (van der Velden y col. 1984, Razin y col. 1981). Esta última estructura tiene un perfil electroforético más complejo que el del esqueleto cromosómico (Pieck y col. 1985, Jeppesen y Morten 1985) lo que resulta compatible con la migración citoplásmica de algunos componentes de la matriz durante la mitosis como es el caso de la lámina, proteínas de los poros complejos (Davis y Blobel 1986), y las RNPhn y RNPsn (Reuter y col. 1985, Spector y Smith 1986, Verheijen y col. 1986); así como con la implicación de la matriz nuclear en la transcripción y en la duplicación del ADN (Berezney 1984, Jackson y Cook 1986) procesos en los que el cromosoma se muestra inerte.

5. LA MATRIZ NUCLEAR DURANTE EL CICLO CELULAR

Durante el ciclo celular la matriz se manifiesta como una estructura dinámica, capaz de desensamblarse en sus partes constituyentes y distribuirse ordenada y heterogéneamente por el citoplasma y los cromosomas mitóticos para volver después a reestructurarse con la organización típica de interfase (Burke y Gerace 1986, Chaly y col. 1984).

5.1 DISTRIBUCION TOPOLOGICA DE LAS PROTEINAS MATRICIALES DURANTE EL CICLO CELULAR

DISTRIBUCION CITOPLASMICA DE LAS LAMINAS

La lámina se comporta diferentemente del resto de la matriz. Las laminas que constituyen los filamentos ortogonales de la lámina interfásica (Aebi y col. 1986), sufren

una hiperfosforilación durante la profase mitótica (Burke y Gerace 1986, Ottaviano y Gerace 1985) y como consecuencia se desensamblan y distribuyen en el citoplasma bien libres en forma monomérica o dimérica como las láminas A, C, o asociadas a vesículas de membrana como la lamina B (Stick 1988). Las 3 laminas permanecen en el citoplasma desde profase hasta anafase, translocándose a las superficies cromosómicas en telofase (Burke y Gerace 1986). Las laminas A y C se reensamblan en los extremos teloméricos de los cromosomas mitóticos (Jost y col. 1986) y la B parece que interacciona con los cromosomas en sus centros organizadores de la envuelta nuclear (Jost y Jhonson 1981) de forma que las vesículas de membrana también se anclan a las superficies cromosómicas. La polimerización de las laminas para formar la lámina interfásica requiere su defosforilación que es catalizada durante telofase por una fosfatasa alcalina citoplásmica (Jost y col. 1986).

DISTRIBUCION CITOPLASMICA DE OTRAS PROTEINAS MATRICIALES

Además de las laminas también se distribuyen citoplásmicamente durante la mitosis: varias proteínas de los poros complejos (Snow y col. 1987), las RNPsn y las RNPhn (Verheijen y col.1986) y la proteína de 125 KD (Philipova y col. 1987) que participa en los procesos que preparan a la célula para la mitosis.

5.2 ASOCIACION DE PROTEINAS MATRICIALES CON LOS CROMOSOMAS METAFASICOS

Algunas proteínas de matriz interna se detectan inmunológicamente en el esqueleto cromosómico (topoisomerasa II, proteínas del cinetocoro) (Earnshaw y col. 1985, Cox

y col. 1983) o asociadas a cromosomas metafásicos como las proteínas de unión al ADN de 60-70 KD (Noaillac-Depeyre y col. 1987).

La matriz interna, por tanto, presenta una distribución heterogénea durante la mitosis, parte de ella forma el esqueleto cromosómico y parte se distribuye en el citoplasma.

6. FUNCIONES DE LA MATRIZ NUCLEAR

La matriz nuclear está implicada en los principales procesos metabólicos que ocurren en el núcleo. En el metabolismo del ADN, organizando los dominios funcionales de ésta molécula (Razin 1987) y participando en el proceso de su síntesis (Smith y col. 1984). En el metabolismo del ARN, participando en los procesos de transcripción (Ciejeck y col. 1982, 1983), maduración (Gallinaro y col. 1983) y transporte del ARN (Agutter 1988, Schröder y col. 1987) y, en la regulación de la expresión génica mediada hormonalmente (Barrack y Coffey 1982).

La estructura continua y dinámica de la matriz nuclear proporciona el soporte físico para la integración de estos procesos que se realizan coordinadamente en asociación con ella (Berezney 1984, Schröder y col. 1987).

6.1 ORGANIZACION DEL ADN LINEAL EN 'LOOPS'

Existe un amplio consenso, basado en datos experimentales, en atribuir a la matriz nuclear el papel de estructura esquelética responsable de organizar al ADN eucariótico en dominios estructurales y funcionales (Paulson y Laemmli 1977, Berezney 1984, Razin

1987).

Omitiendo la digestión con DNasa en el procedimiento de extracción, se ha conseguido la visualización de una estructura matricial con el ADN total asociado formando lazos con sensibilidad aumentada a DNasa I (Cook y Brasell 1976, Cook y col. 1976, Benyajati y Worcell 1976, Vogelstein y col. 1980).

El ADN lineal eucariótico está organizado en dominios o lazos de tamaño variable (30-300 Kpb) anclados por sus extremos a la matriz nuclear proteica (Hancock y Hughes 1982, Berezney 1984). Estos lazos son estructuras dinámicas (Cook y Brazell 1976, Cook y col. 1976) de diferentes tipos y son los responsables de la organización topológica del ADN interfásico (Hancock y Hughes 1982, Berezney 1984, Razin 1987), así como de la expresión génica (Burdon y col. 1985).

Se han detectado numerosas proteínas matriciales en la base del lazo de ADN (Razin y col. 1981, Bodnar y col. 1983), lo que sugiere que su organización es compleja. Se pueden distinguir al menos dos grupos de proteínas que pueden ser liberadas por distintos tratamientos (Razin y col. 1981). Un grupo parecen estar unidas directamente al ADN por unión covalente resistiendo el tratamiento mercaptoetanol-sarcosil, y un segundo grupo podrían estar unidas indirectamente al ADN, a través de algunas proteínas del grupo anterior por medio de puentes disulfuro, las cuales resisten el tratamiento con sarcosil pero se disocian con mercaptoetanol (Razin y col. 1981).

En la periferia nuclear, los cromosomas son mantenidos durante toda la interfase en posiciones fijas por medio de uniones ADN-lámina, el ADN de estas uniones tiene

una longitud aproximada de 10 Kb, es rico en A/T y bastante homogéneo en su secuencia (Razin 1987).

6.2 DUPLICACION DEL ADN EN LA MATRIZ

Está bien establecido que la matriz interna es el lugar en donde se produce la duplicación del ADN. El ADN de nueva síntesis (Berezney y Coffey 1975), así como los fragmentos de Okazaki e intermedios de duplicación se asocian a la matriz (Jackson y Cook 1986) y también las principales enzimas replicativas (ADN polimerasa α, β y primasa) (Nishizawa y col. 1984, Smith y col. 1984, Foster y Collins 1985, Wood y Collins 1986). La matriz puede continuar "in vitro" la síntesis de ADN en las horquillas de replicación iniciadas "in vivo" (Tubo y col. 1985). Estos lugares de replicación se han localizado por inmunofluorescencia (Nakayasu y Berezney 1989) o autorradiografía (Pardoll y col. 1980), y están distribuidos por la matriz interna como "gránulos de replicación" que contienen grupos de replicones asociados (Nakayasu y Berezney 1989), conociéndose la variación topográfica de su replicación a lo largo de la fase S (Nakayasu y Berezney 1989).

La duplicación del ADN se produce en familias de replicones unidos a la matriz interna (Nakayasu y Berezney 1989). Una familia es el conjunto de replicones que se duplica coordinada y simultáneamente en un momento determinado de la fase S (Lau y Arrigui 1981). Cada replicón forma un lazo cerrado en su base por proteínas de la matriz (Wanka y col. 1982). En el inicio de la fase S o quizá antes (Smith y Berezney 1980, 1983) se unen a la base de cada lazo dos complejos replicacionales adyacentes, responsables de la duplicación bidireccional del ADN cuando éste pasa a través de ellos (Wanka y col. 1982). Mientras el ADN se está duplicando existen en el replicón

dos puntos de unión ADN-matriz (Wanka y col. 1982). Los orígenes de replicación son lugares de asociación permanentes durante todo el ciclo celular, mientras que las horquillas de replicación están unidas sólo durante la fase S (Razin 1987). El ADN ya duplicado se sitúa entre ambos puntos de unión (Wanka y col. 1982) desapareciendo la unión de la horquilla cuando finaliza la duplicación del replicón (Razin 1987).

6.3 LA MATRIZ Y EL METABOLISMO DEL ARN

LA MATRIZ LUGAR DE SINTESIS DEL ARN

Numerosos datos experimentales demuestran que la matriz es el lugar donde se produce la síntesis del ARN. Los genes en transcripción activa (Ciejek y col. 1983, Robinson y col. 1983) y los potencialmente transcribibles se asocian selectivamente con la matriz nuclear (Razin 1987) a través de lugares de unión ADN-matriz interna que son de naturaleza transitoria en el primer caso; y a través de lugares estables situados en los extremos 5' de genes potencialmente transcribibles en el segundo caso (Razin 1987). Las principales enzimas catalizadoras de transcripción como ARN polimerasa II, poly A polimerasa (Lewis y col. 1984, Schröder y col. 1984), así como el ARN de nueva síntesis (Puvion y Moyne 1981, Fakan y col. 1976) y productos génicos concretos: el ARN precursor de β -globina, ovoalbúmina y ovomucoide, ARNs preribosómicos de 32S y 45S y transcritos virales (Ross y col. 1982, Ciejek y col. 1982, Abufalia y col. 1984), también se han localizado en la matriz. Las estructuras ribonucleoproteicas correspondientes a los productos de la transcripción "in situ" tales como las fibrillas pericromatínicas se reconocen en la matriz interna al M.E. (Berezney y Coffey 1977, Smith y col. 1986).

LA MATRIZ LUGAR DE PROCESAMIENTO DEL ARN

La localización conjunta de RNPs_n y RNPs_h en estadios intermedios de procesamiento, en fibrillas ribonucleoproteicas de la matriz interna (Gallinaro y col. 1983) señalan a esta estructura como lugar de maduración del ARN (Schröder y col. 1989).

LA MATRIZ Y EL TRANSPORTE DEL ARN

Se ha propuesto que la matriz nuclear es el soporte físico responsable del transporte nucleocitoplásmico del ARN y que esta molécula permanece unida a la matriz desde el momento de su síntesis hasta el de su liberación en el citoplasma a través de los poros complejos (Agutter 1988, Schröder y col. 1989). Los datos experimentales más recientes están consolidando el concepto de que el transporte del ARN se produce siempre en estado sólido, es decir, unido a estructuras esqueléticas celulares: matriz nuclear, poro complejo y citoesqueleto (Agutter 1988, Schröder y col. 1989).

En el transporte del ARNm del núcleo al citoplasma se consideran tres fases principales que implican procesos de asociación/disociación en lugares específicos de estructuras esqueléticas: la liberación del ARNm de su lugar de unión intranuclear en la matriz interna, la traslocación del ARNm a través del poro complejo y su unión posterior al citoesqueleto (Schröder y col. 1989).

A nivel de la matriz esta hipótesis viene apoyada por un conjunto de datos experimentales. El ARNm permanece asociado a esta estructura desde su síntesis y

también durante su maduración (Miller y col. 1978), y sólo es liberado de ella después de la excisión del último intrón (Agutter 1988). Una vez maduro el ARNm se libera de la matriz en presencia de ATP y cationes divalentes (Schröder y col. 1987); aparentemente la actina nuclear está implicada en la unión del ARN a la matriz nuclear (Nakayasu y Ueda 1985). Solo los ARNm maduros son transportados desde la matriz al citoplasma a través de los poros complejos (Maul 1977); su traslocación parece estar asociada a cambios en su estructura tridimensional (Skoglund y col. 1983) y composición proteínica (Bag 1984) y requiere hidrólisis de ATP (Webb y col. 1981). La ruptura de la molécula de ATP, con el consiguiente desprendimiento de energía necesario para la translocación, es catalizada por una NTPasa (Agutter y Thomsom 1989) que parece estar localizada en la cara interna de la envuelta nuclear (Clawson y col. 1984). Existe en el poro una proteína transportadora específica (p110) a la cual parece unirse el ARNm a través de su cola de poly A (Bachman y col. 1984) previa fosforilación del lugar de unión (Mc Donald y Agutter 1980).

Inmediatamente después de su translocación el ARNm se une al citoesqueleto (Jeffery 1982) a través del sistema de microfilamentos (Ramaekers y col. 1980) o del de F.I. (Howe y Hershey 1984) del tipo de las citoqueratinas (Grossi de Ba y col. 1988). Esta unión es un prerequisite para su traducción (Bonneau y col. 1985).

6.4. LA MATRIZ Y LA ACCION HORMONAL

El descubrimiento de que genes inducibles por hormonas esteroideas se asocian con la matriz nuclear (Robinson y col. 1983), la localización de lugares aceptores en la malla interna (Barrack y Coffey 1982), la visualización en el ME de receptores específicos de tejido y de hormona sobre el ADN matricial (Kirschy col. 1986) y la

determinación por electroforesis de que ciertas proteínas matriciales se fosforilan de forma correlacionada con la estimulación de la transcripción génica mediada hormonalmente (Sevaljevick y col. 1982), apoyan la hipótesis de que la matriz nuclear está implicada en la regulación de la expresión génica probablemente modulando la estructura de la cromatina (Kirsch y col. 1986) y determinando la disponibilidad de lugares para la unión de la ARN polimerasa a la eucromatina (Sevaljevick y col. 1982).

7. EFECTOS DEL PROCEDIMIENTO DE EXTRACCION SOBRE LA ULTRAESTRUCTURA Y COMPOSICION QUIMICA DE LA MATRIZ NUCLEAR

7.1 PROCEDIMIENTO GENERAL DE OBTENCION DE MATRICES NUCLEARES

En términos generales, el procedimiento secuencial de obtención de matrices nucleares consiste en tratamientos sucesivos de los núcleos con detergentes no iónicos, soluciones de baja y alta fuerza iónica y digestión con nucleasas (Berezney y Coffey 1974, Wanka y col. 1977, Kuzmina y col. 1981) y tiene como finalidad aislar la estructura mínima que es necesaria para mantener la forma nuclear y su compartimentalización básica (Berezney 1979). Todas estas extracciones afectan de forma dramática a la composición química y a la organización estructural del núcleo.

EXTRACCION CON DETERGENTES NO IONICOS

Sus efectos principales son la solubilización de los lípidos de las membranas nucleares (99%) y a nivel de ultraestructura la pérdida de la morfología típica de la envuelta nuclear que a partir de esta extracción es observada como una capa fibrilar

continua de estructura compleja, densa a los electrones (Kauffman y col. 1981, Berezney 1979).

EXTRACCION CON SOLUCIONES DE BAJA FUERZA IONICA

Se han empleado varios tipos de soluciones con baja fuerza iónica: tampones con baja concentración de Mg^{++} (0.2-0.5 mM) (Berezney 1979, Kauffman y col. 1981, Bouvier y col. 1984), o con EDTA (1-2 mM) (Long y Schrier 1983) o con iodosalicilato de Litio (LIS) (10-25 mM) (Gasser y Laemmli 1986, Phi Van y Strätling 1988) o con polianiones (sulfato dextrano y heparina) (Adolph 1980).

La extracción con bajas concentraciones de Mg^{++} se emplea en preparaciones convencionales antes de la extracción con alta salinidad y tiene como efectos principales la eliminación de cantidades importantes de ADN nuclear (75%), proteína (50%) y ARN (20%) y a nivel estructural la reducción de las masas de cromatina condensada que se observan al M.E. como fibras gruesas muy densas a los electrones después de este tratamiento (Berezney y Coffey 1974).

EXTRACCION CON ALTA FUERZA IONICA

En esta extracción se eliminan de los núcleos las histonas y otras proteínas no histónicas solubles. Los procedimientos convencionales emplean sales como ClNa (2M) o ClK (0.4-1M) y $SO_4(NH_4)_2$ (0.4M) (Berezney y Coffey 1974, Gallinaro y col. 1983, Verheijen y col. 1986). La acción del tampón de alta salinidad se realiza disociando las interacciones electrostáticas que puedan existir en el núcleo "in vivo" y como consecuencia se liberan cantidades importantes de ADN, proteína y ARN nuclear

(Berezney y Coffey 1974, Verheijen y col. 1986).

La extracción con EDTA, LIS o polianiones tiene como objetivo evitar las condiciones de alta fuerza iónica en la obtención de matrices nucleares (Long y Ochs 1983, Mirkovitch y col.1984). Estos procedimientos al igual que la extracción con las otras sales eliminan de los núcleos las histonas y otras proteínas solubles (Long y Ochs 1983, Mirkovitch y col. 1984). En particular, la extracción con LIS resulta adecuada si se quieren estudiar las secuencias específicas de ADN unidas a la matriz (Mirkovitch y col.1984) ya que este agente parece evitar el deslizamiento del ADN sobre sus lugares de unión a matriz producido en las extracciones de alta fuerza iónica (2M ClNa) (Mirkovitch y col. 1984, Phi Van y Strätling 1988, Gasser y Laemmli 1986).

Arenstorf y col.(1984) han mostrado también que las proteínas A y B de las RNPhn pueden reasociarse artefactualmente en presencia de tampones de alta fuerza iónica formando fibras de diámetro regular y aspecto helicoidal que se estabilizan por puentes disulfuro después de la digestión con nucleasas (Lothstein y col. 1985).

TRATAMIENTO CON NUCLEASAS EXOGENAS

Generalmente consiste en tratamientos exhaustivos con altas concentraciones de DNasa I y RNasa A que digieren el ADN y ARN nuclear (Berezney y Coffey 1974, Comings y Okada 1976). Como consecuencia desaparecen de los núcleos las masas de cromatina condensada (Berezney y Coffey 1974).

Las extracciones salinas producen colapsamiento y agregación de las regiones nucleoplásmicas que contienen altas concentraciones de cromatina (Okada y Comings

1980, Burkholder 1983) y pueden producir matrices nucleares "artefactuales", que además podrían englobar otros componentes nucleares que no serían matriciales "sensu strictu". Por ello, en el caso de que los núcleos no posean actividad de DNasa endógena y las digestiones con nucleasas se realicen posteriormente a la extracción con alta salinidad, es necesario una digestión inicial con bajas concentraciones de DNasa I, con el fin de prevenir el gel de ADN que se produce después de la deshistonización como consecuencia del tratamiento con alta fuerza iónica (Berezney y Coffey 1977).

Si se pretende mapear las secuencias génicas del ADN matricial, entonces es preciso realizar las digestiones con nucleasas mediante enzimas de restricción (Gasser y Laemmli 1986).

7.2 VARIACIONES DEL PROCEDIMIENTO DE EXTRACCION Y SU REPERCUSION SOBRE LAS ESTRUCTURAS MATRICIALES

Entre las variantes del procedimiento convencional, tres de ellas proporcionan bastante información acerca de la naturaleza de las interacciones que estabilizan la matriz nuclear. Esta estructura es afectada por la ausencia de cationes divalentes en los tampones de extracción (Lebkowski y Laemmli 1982, Bouvier y col. 1985, Dijkwell y Wenink 1982, Bekers y col. 1986), la inducción de enlaces disulfuro entre grupos -SH (Kauffman y col. 1981, Kauffman y Shaper 1984, Jeppesen y Morten 1985) y el orden de las extracciones en la secuencia de aislamiento, en particular realizar las digestiones con nucleasas antes de la extracción salina (Dwyer y Blobel 1976, Kauffman y col. 1981, Bouvier y col. 1985, Bouvier y col. 1982).

EFEECTO DE LAS CONDICIONES DE DIGESTION CON RNasa

Poco después de que Berezney y Coffey (1974) aislaran "matrices nucleares" de hígado de rata, Dwyer y Blobel (1976) publicaron un procedimiento muy similar para obtener la fracción lámina-poros en el mismo tipo de núcleos. Ambos procedimientos eran similares y consistían en digestiones nucleásicas y extracción con Tritón X-100 y alta salinidad (Berezney y Coffey 1974, Dwyer y Blobel 1976) pero invertían el orden en la secuencia de extracción, Dwyer y Blobel realizando las digestiones con nucleasas antes de la extracción salina obtenían la fracción lámina-poro, mientras que Berezney y Coffey conseguían matrices nucleares completas al efectuar las digestiones con nucleasas después de la extracción salina. Los experimentos de Kauffman y col. (1981) proporcionaron la primera explicación satisfactoria a esta aparente contradicción al demostrar que las digestiones previas a la extracción en alta salinidad son muy efectivas para eliminar el ARN de la matriz interna y del nucleolo; mientras que si la digestión con nucleasas se realiza después de la extracción salina, un porcentaje importante de ARN se vuelve resistente a la digestión y permanece en el interior nuclear. Este ARN matricial remanente parece indispensable para mantener la estabilidad de la matriz interna y del nucleolo residual. Los experimentos de algunos autores (Bouvier y col. 1982, Bouvier y col. 1985) corroboran este mismo supuesto, la matriz interna y el nucleolo residual parecen estabilizarse por interacciones ARN-proteína.

Sin embargo, este punto permanece abierto y conflictivo porque existen experimentos de otros autores en los que la digestión con RNasa no afecta la estabilidad de la malla interna, que sin embargo desaparece completamente tras digestión con proteasas (Miller y col. 1978, Pouchelet y col. 1986), sugiriendo que el ARN se asocia a la matriz nuclear que estaría estabilizada exclusivamente por interacciones proteína-proteína.

Todos estos resultados tomados en conjunto llevan a pensar que existiría "in situ" un delicado entramado fibrilar estabilizado por la asociación de las RNPhn y RNPsn. A nivel molecular el tratamiento con alta concentración salina supone una disrupción violenta y esta matriz interna sólo podría resistir la extracción en caso de estar estabilizada, es decir presentar RNPs asociadas a ella.

EFEECTO DE LOS CATIONES DIVALENTES

El ambiente iónico afecta la morfología de conjunto de la matriz nuclear especialmente a la matriz interna y a los nucleolos residuales.

La matriz interna es estabilizada por cationes divalentes tanto en sus dominios de cromatina (Lebkowski y Laemmli 1982) como en sus dominios ribonucleoproteicos (Bouvier y col. 1985).

En los dominios de cromatina, las interacciones metaloproteicas parecen imprescindibles para mantener la organización de los lazos de ADN unidos a la matriz (Lebkowski y Laemmli 1982, Dijkwel y Wennink 1986) al igual que sucede en el esqueleto cromosómico (Lebkowski y Laemmli 1982).

En los dominios ribonucleoproteicos, La presencia de Mg^{++} parece necesaria para que los complejos de RNP establezcan conexiones y formen una malla intranuclear resistente a la extracción salina y a la digestión con RNasa (Bouvier y col. 1985).

Los cationes divalentes son también necesarios para mantener la configuración

espacial ordenada de la matriz en su conjunto (Bekers y col. 1986, Long y Ochs 1983); puesto que tanto la matriz interna (Beckers y col. 1982), como los nucleolos residuales (Long y Ochs 1983, Bouvier y col. 1982) se desorganizan aunque estén presentes en el nucleoesqueleto cuando las digestiones con nucleasas (DNasa o RNasa) se realizan en ausencia de cationes divalentes (Bekers y col. 1986, Long y Ochs 1983).

EFECTO DE LA OXIDACION DE GRUPOS SULFHIDRILO

Algunos datos experimentales indican que la oxidación de grupos sulfhidrilo es imprescindible para obtener la matriz interna y la matriz nucleolar porque cuando se emplean agentes reductores en el proceso de extracción se recuperan en algunos casos esferas nucleares vacías (Kauffman 1981, Kauffman y Shaper 1984).

La recuperación de proteínas específicas (los polipéptidos matriciales de 60-70 KD y P.I. 8 y las proteínas de 32-36 KD de las partículas 40S de las RNPhn) cuando se emplean condiciones oxidantes en la extracción (Kauffman y Shaper 1984), sugiere que *la aparición del material intranuclear no es un artefacto de la preparación*, aunque la oxidación "in vitro" se presente en este caso como un modo de estabilización de estructuras internas matriciales. Los puentes disulfuro parecen necesarios para que proteínas de la matriz interna y del nucleolo residual formen una malla intranuclear resistente a la extracción salina y a la digestión con nucleasas (Kauffman y Shaper 1984, Kaufman y col. 1981).

Dado que la matriz interna y el nucleolo residual son estructuras lábiles que necesitan cationes divalentes y puentes disulfuro para mantener su estabilidad han surgido ciertas críticas acerca de su existencia "in vivo" y algunos autores las consideran

un artefacto producido durante el procedimiento de extracción (Wunderlich y col. 1983, Hadlacky y col. 1981). Sin embargo, los datos actuales están confirmando la realidad de una estructura esquelética en el interior nuclear. Se consideran como constituyentes de la misma (Agutter 1988) el grupo complejo de proteínas que forma la base del lazo de ADN (Lebkowski y Laemmli 1982) responsables de organizar a esta molécula para la replicación y la transcripción; y la malla de actina nuclear (Nakayasu y Ueda 1985), soporte físico del transporte de RNPhn hasta el citoplasma (Schröder y col.1987); aunque se desconoce la conexión que puede haber entre ambos dominios de la matriz y su organización precisa en el interior nuclear.

Ya que los componentes polipeptídicos de la matriz nuclear deben establecer "cross-linking" más rápidamente entre si que con los otros componentes nucleares no matriciales, actualmente se están efectuando estudios de "cross-linking" "in situ" como metodología para conseguir una información más satisfactoria sobre la composición proteínica de la matriz.

OBJETIVOS DEL TRABAJO

La matriz nuclear es una subestructura del núcleo eucariótico que ha suscitado una abierta polémica desde el mismo momento en que se pusieron a punto procedimientos experimentales para obtenerla. Su interés radica en que el conocimiento preciso de la misma, puede modificar radicalmente el concepto que hasta los años 70-80 se tenía del núcleo celular y la polémica se centra fundamentalmente en la sospecha de que pudiera ser un artefacto generado como consecuencia de ciertos procedimientos de extracción.

Aunque es una subestructura exhaustivamente estudiada en sistemas animales (mamíferos, aves, anfibios, insectos), existen muy pocos trabajos que aborden el tema en eucariotas inferiores y células vegetales. De hecho no se consiguió un fraccionamiento celular eficiente y repetitivo para preparar matrices nucleares de plantas hasta los años 80 y por tanto su estudio está muy atrasado respecto al de otros sistemas. Para llenar este vacío, hemos realizado un estudio de la matriz nuclear de células meristemáticas de *Allium cepa*, cuyos objetivos generales han sido: Determinar su composición polipéptidica básica y conocer los efectos que sobre la ultraestructura y composición polipéptidica de la matriz ejercen procedimientos de extracción que en otros sistemas celulares afectan a su composición y conllevan la pérdida de elementos internos o inducen desorden en los mismos, monitorizando la posible formación de artefactos durante el procedimiento de extracción; y finalmente correlacionar los datos obtenidos en plantas con los existentes en otros sistemas y evaluar la conservación de esta estructura en la evolución del núcleo eucariótico.

Estos objetivos generales se concretan en una serie de objetivos específicos llevados a cabo mediante técnicas de M.E. convencional, técnicas inmunocitoquímicas y citoquímicas para M.E., electroforesis de proteínas, reconstrucción tridimensional con

ordenador a partir de cortes seriados y fluorescencia.

1. Determinación de la composición polipeptídica de las matrices obtenidas mediante diferentes procedimientos de extracción y también de las sucesivas fracciones nucleares intermedias.

Los procedimientos de extracción seleccionados han sido los que en otros sistemas celulares conllevan desaparición de elementos internos o variantes que permiten la aparición de los mismos, y que han conducido a proponer que algún tipo de ARN, los puentes disulfuro y los cationes divalentes son imprescindibles para la estabilización de la matriz nuclear y la recuperación de elementos internos en las mismas.

2. Análisis de la estructura fina y organización tridimensional de las matrices obtenidas por los diferentes procedimientos.

Establecimiento de las características ultraestructurales típicas del sistema estudiado y correlación con las descritas en otras especies.

3. Estudio comparativo de la ultraestructura y composición polipeptídica de las matrices nucleares obtenidas, con el fin de conocer si la sensibilidad a los diferentes procedimientos de extracción es o no atribuible a características propias del tipo celular.

4. Detección de los ácidos nucleicos residuales asociados a la matriz nuclear mediante técnicas altamente sensibles de inmunomarcado y tinción preferencial. La caracterización estructural de estos ácidos nucleicos permite establecer los dominios de cromatina y ribonucleoproteicos de la matriz nuclear, y resulta de interés teniendo en cuenta las funciones atribuidas a la matriz en el mantenimiento de los lazos de

ADN, en la organización supramolecular de la replicación y la transcripción génica, y en la maduración y transporte de los productos génicos hacia el citoplasma.

5. Localización de proteínas altamente fosforiladas que son componentes típicos de la matriz nuclear en otros sistemas; principalmente los G.I. componentes de la matriz nuclear interna en sistemas animales, y la nucleolina una proteína nucleolar estructural que participa en múltiples pasos de la transcripción y procesamiento de los genes ribosómicos; procesos en los cuales se considera implicada a la matriz nuclear.

La localización de dominios de cromatina, dominios ribonucleoproteicos, G.I. y nucleolina en la matriz nuclear de *Allium cepa*, permiten establecer amplias analogías entre las matrices nucleares de sistemas animales y vegetales y al mismo tiempo son importantes estructuras de referencia que posibilitan las correlaciones entre las estructuras matriciales y el núcleo "in situ".

MATERIAL Y METODOS

1. MATERIAL DE ESTUDIO

El material utilizado fueron bulbos de cebolla (*Allium cepa* L.) variedad francesa obtenidos comercialmente.

2. METODO DE CULTIVO DE MERISTEMOS RADICALES

Los bulbos de cebolla se germinaron en gradillas sobre tubos de vidrio. Como medio de cultivo se utilizó agua corriente filtrada que fué renovada cada 24 horas, con un sistema de aireación constante de 10-20 ml de aire/min. conseguido con una bomba de aireación RENA SUPER.

El sistema de cultivo se colocó en el interior de una cámara REFRITHERM-5 (STRUERS) que mantiene la temperatura constante a $15 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. De esta forma se consigue también la oscuridad conveniente para el desarrollo de las raíces. Estas presentan un tamaño adecuado (2-3 cms.) a las 48 horas de su inmersión en agua. Para un experimento de extracción de matrices nucleares es necesaria una plantación aproximada de 20 bulbos.

3. AISLAMIENTO DE NUCLEOS MERISTEMATICO

Cuando las raíces han alcanzado la longitud apropiada, se hacen tomas de las zonas meristemáticas de las mismas, cortando los apices (aproximadamente 2 mm) con pinzas de disección, y se introducen en una placa Petri sobre hielo que contiene medio de extracción en proporción 3:1 (Greimers y Deltour 1981). Este medio es una

modificación del medio de aislamiento de Kuehl y Honda (Kuehl 1964, Honda y col.1966) y contiene:

2% Goma arábica purificada

30% Glicerol

1.5% Ficoll

2.5% Dextrano

100 mgr/ml Seroalbúmina bovina

50 mM Acetato Magnésico

0.5 mM EDTA

8 mM 2-mercaptoetanol

4 mM n-octanol

1 mM fluoruro de fenil metilsulfonilo (PMSF)

6.8 mM dietilpirocarbonato

Está ajustado a pH 7.8.

Inmediatamente después de las tomas, se trocean los ápices con una cuchilla para facilitar la infiltración del medio en el tejido y la posterior homogeneización del material.

Una vez troceadas, las raíces se desgasifican sobre hielo en una campana conectada a una bomba de vacío y se las mantiene en vacío suave (1 atmósfera) durante 50 minutos, para facilitar la difusión del medio al interior de las células.

Tras una incubación con el medio de extracción a 4°C durante la noche, se cambia el medio de extracción y los ápices meristemáticos se homogenizan durante 40 segundos

con un homogenizador de alta velocidad (20.000 rpm; ULTRA-TURRAX TP18/10. Janke y Kinkel). El homogenizado se filtra a través de 3 filtros de poliamida superpuestos, con poros de 100, 50 y 30 μm de diámetro. Los fragmentos de raíz retenidos en el filtro de 100 μm se resuspenden en medio de extracción fresco y son homogeneizados y filtrados de nuevo. Esta operación se repite 2 veces siempre sobre hielo.

Los núcleos se sedimentan por centrifugación a 2440 rpm durante 20 min a 4°C en una centrífuga refrigerada SIGMA 2KD. Se elimina el sobrenadante y se redisuelve en medio de extracción fresco. El proceso se repite 2 veces más.

Una vez aislados los núcleos se toman muestras del "pellet" y se comprueba al microscopio óptico su grado de pureza y preservación estructural, mediante tinción con una solución de verde de metilo acético al 6%.

4. AISLAMIENTO DE MATRICES NUCLEARES

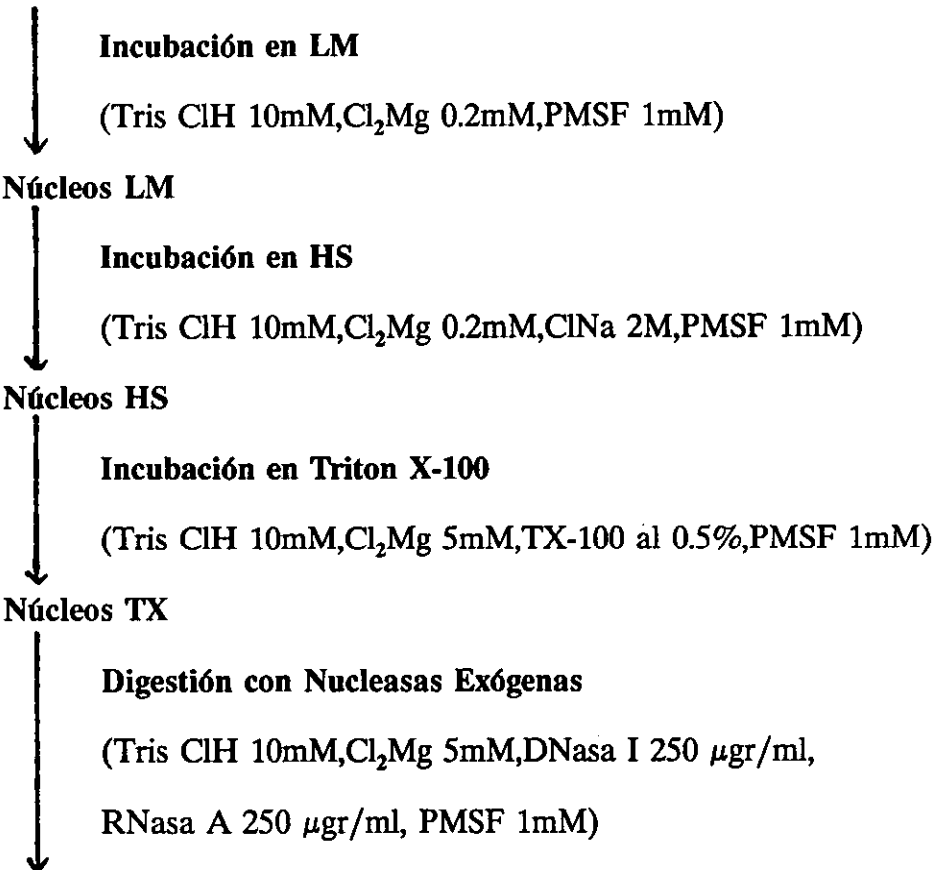
Consiste en una serie de extracciones sucesivas a las que se someten los núcleos aislados para la eliminación del ADN, ARN, lípidos y proteínas solubles de los mismos. Todas las extracciones se efectuaron a 4°C.

METODO CLASICO DE BEREZNEY Y COFFEY (1974) (TABLA V)

1ª EXTRACCION

a) Se resuspenden los núcleos aislados en un tampón con baja concentración de Magnesio (TRIS ClH 10 mM, Cl_2Mg 0.2 mM, PMSF 1mM pH 7.4), al que llamaremos

NUCLEOS AISLADOS



MATRIZ NUCLEAR (PROC I)

TABLA V. Preparación de matrices nucleares según el método de Berezney y Coffey (1974)

abreviadamente tampón LM.

b) Se incuban durante 20 minutos sobre hielo.

c) Se centrifuga la suspensión nuclear a 2440 rpm y 4° C durante 20 minutos.

d) Se lava el "pellet" 3 veces en tampón "standard" con una concentración más alta de Magnesio (Tris ClH 10mM, Cl_2Mg 5mM, PMSF 1 mM, pH 7.4), que llamaremos abreviadamente tampón TM.

2ª EXTRACCION

a) Se resuspende el "pellet" en un tampón con alta fuerza iónica (Tris ClH 10 mM, 0.2mM Cl_2Mg , 2MClNa, PMSF 1 mM) al que llamaremos abreviadamente tampón HS.

b) Se incuban durante 20 minutos sobre hielo.

c) Se centrifuga 20 minutos a 4° C y 2.440 rpm.

d) Se lava el "pellet" 3 veces en tampón TM.

3ª EXTRACCION

a) Se resuspende el "pellet" en tampón TM que contiene un detergente no iónico Tritón X -100 (Tris ClH 10 mM, Cl_2Mg 5mM, Tritón X-100 al 0.5%, PMSF 1 mM, pH 7.4).

b) Se incuba 10 minutos sobre hielo.

c) Se lava el "pellet" en TM 3 veces.

4ª EXTRACCION

Consiste en una digestión de los núcleos con altas concentraciones de DNasa I y

RNasa A para obtener las matrices nucleares.

- a) Se resuspende el "pellet" anterior en medio TM al que hemos añadido 250 $\mu\text{gr/ml}$ RNasa A y 250 $\mu\text{gr/ml}$ DNasa I.
- b) Esta suspensión se incuba una hora en un baño térmico a 22°C.
- c) Se lava el "pellet" en tampón TM 3 veces.

AISLAMIENTO DE MATRICES NUCLEARES MEDIANTE DIGESTIONES CON DNasa I Y RNasa A PREVIAS A LA EXTRACCION CON TAMPON DE ALTA FUERZA IONICA

Este procedimiento es esencialmente idéntico al clásico de Berezney y Coffey (1974), pero el orden de la secuencia de extracciones es diferente (TABLA VI).

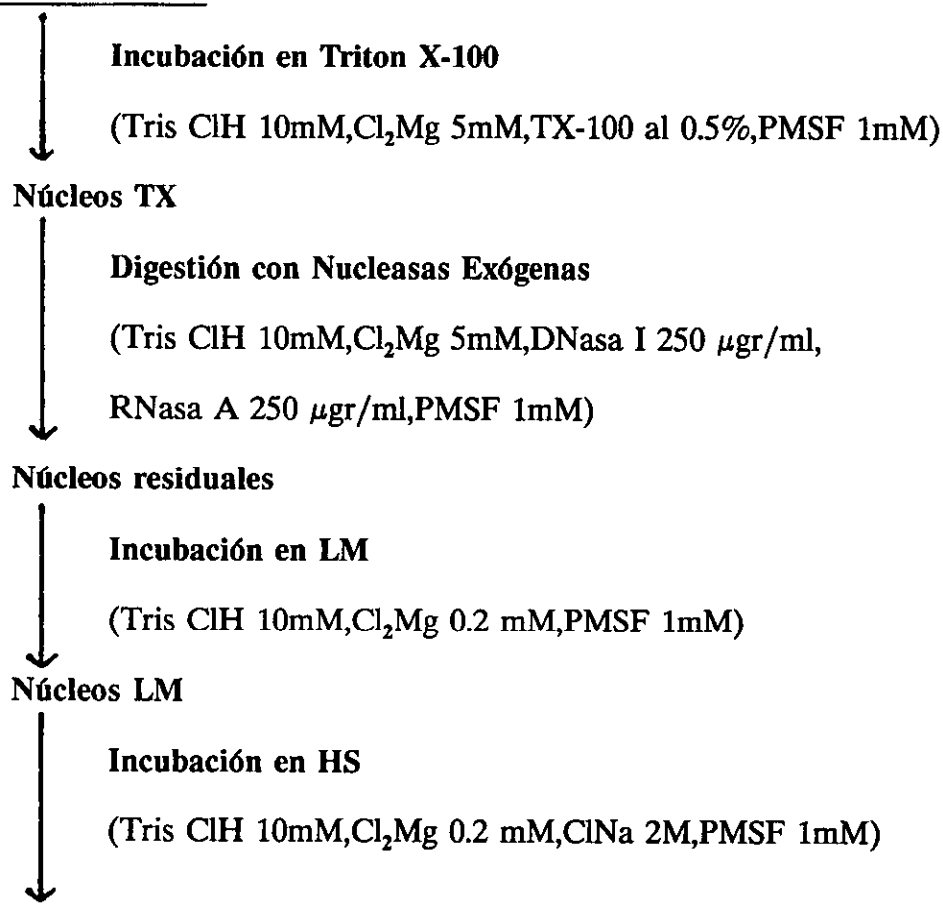
1ª EXTRACCION

- a) Suspensión de los núcleos aislados en tampón TM
- b) Incubación durante 10 minutos en hielo.
- c) Centrifugación a 2440 rpm y 4°C durante 20 min.
- d) 3 lavados en tampón TM.

2ª EXTRACCION

- a) Digestión de los núcleos en tampón TM conteniendo 250 $\mu\text{gr/ml}$ DNasa I y 250

NUCLEOS AISLADOS



MATRIZ NUCLEAR (PROC II)

TABLA VI. Preparación de matrices nucleares mediante digestiones con nucleasas previas a la extracción en tampón de alta fuerza iónica.

$\mu\text{gr/ml}$ RNasa A durante 1 hora a 22°C.

b) Centrifugación a 2.440 rpm y 4°C durante 20 min.

c) 3 Lavados en tampón TM.

3ª EXTRACCION

a) Incubación de los núcleos en tampón LM durante 20 min. sobre hielo

b) Centrifugación a 2.440 rpm y 4°C durante 20 min.

c) 3 lavados en tampón TM.

4ª EXTRACCION

a) Incubación de los núcleos en tampón HS durante 20 min sobre hielo.

b) Centrifugación a 2.440 rpm y 4°C durante 20 min.

c) 3 lavados en tampón TM.

OBTENCION DE MATRICES NUCLEARES SIN DIETILPIROCARBONATO

NI ACETATO DE MAGNESIO EN EL MEDIO DE AISLAMIENTO DE NUCLEOS

En este tratamiento se omiten el Acetato de Mg y el dietilpirocarbonato en el medio de aislamiento de núcleos. El procedimiento de extracción secuencial es identico al explicado en el apartado 4-2.

AISLAMIENTO DE MATRICES NUCLEARES EN AUSENCIA DE CATIONES DIVALENTES.

En este procedimiento se utiliza un tampón de extracción sin Cl_2Mg (Tris ClH 10 mM, PMSF 1 mM a pH 7.4) que llamaremos tampón tris ClH .

La secuencia de extracciones es idéntica a la descrita en el apartado 4-2.

OBTENCION DE MATRICES NUCLEARES A PARTIR DE NUCLEOS INCUBADOS CON 2mM TTNa Y 40 mM DTT.

OBTENCION DE MATRICES NUCLEARES INCUBADAS CON 2mM TTNa.

Después de aislar los núcleos según se indicó previamente, se incuban con 2 mM TTNa durante una hora y a continuación se someten a una serie de extracciones sucesivas para obtener las matrices nucleares (TABLA VII). Este método se basa en esencia en el descrito por Long y col (1979).

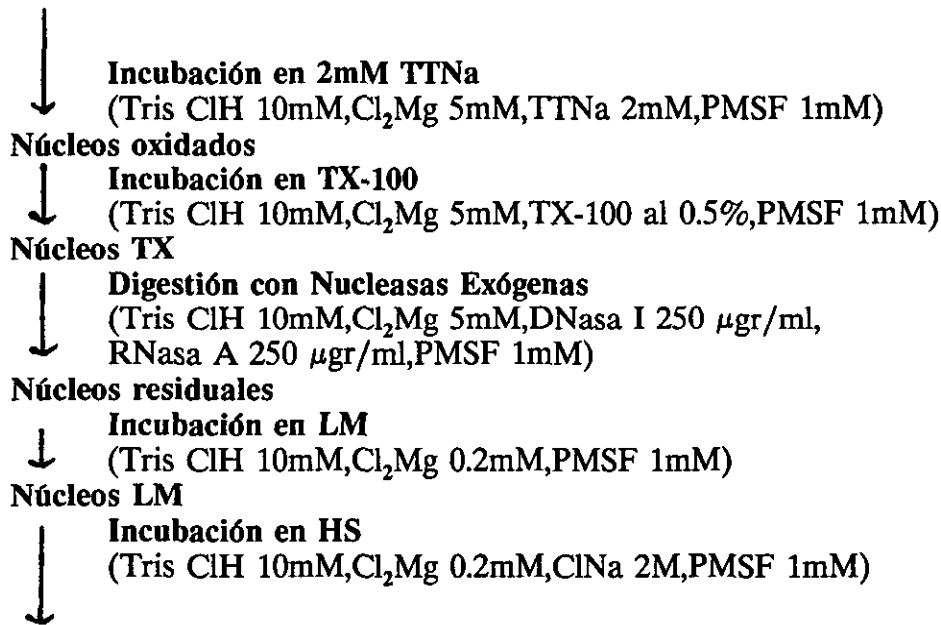
INCUBACION CON TTNa

- a) Se resuspenden los núcleos en tampón TM que contiene 2mM TTNa y se incuban durante 1 hora sobre hielo.
- b) Se centrifugan a 2.440 rpm y 4°C durante 20 min.
- c) Se lava el "pellet" en tampón TM 3 veces.

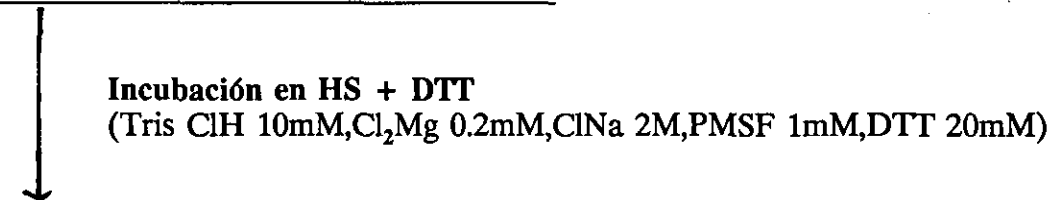
EXTRACCION CON TRITON-X 100

- a) Se resuspenden los núcleos en tampón TM que contiene Tritón-X 100 al 0.5%

NUCLEOS AISLADOS



MATRICES NUCLEARES OXIDADAS (PROC III)



MATRICES NUCLEARES REDUCIDAS (PROC IV)

TABLA VII. Preparación de matrices nucleares a partir de núcleos incubados con TTNa.

- b) Se incuban 10 min en hielo.
- c) Se centrifugan a 2.440 rpm y 4°C durante 20 min.
- d) Se lava el "pellet" 3 veces en tampón TM.

DIGESTION CON NUCLEASAS EXOGENAS

- a) Se resuspenden los núcleos en tampón TM que contiene 250 $\mu\text{gr/ml}$ RNasa A y 250 $\mu\text{gr/ml}$ DNasa I.
- b) Se incuban 1 hora a 22°C.
- c) Se centrifugan a 2.440 rpm y 4°C durante 20 min.
- d) Se lava el "pellet" en tampón TM 2 veces.

EXTRACCION EN MEDIO DE BAJA FUERZA IONICA

- a) Se resuspende la fracción anterior en tampón LM
- b) Se incuban 30 min. en hielo
- c) Se lava el "pellet" en tampón TM 3 veces

EXTRACCION EN MEDIO DE ALTA SALINIDAD

- a) Se redisuelve el "pellet" anterior en tampón LM y se añade lentamente el mismo volumen de tampón que contiene 4M ClNa, de forma que la concentración salina será de 2M ClNa en los núcleos residuales.
- b) Se incuban 15 min en hielo.
- c) Se centrifugan a 2.440 rpm y 4°C durante 20 min.

- d) Se elimina el sobrenadante y se repite el proceso anterior.
- e) Se centrifuga a 2.440 rpm y 4°C durante 20 min.
- f) Se lava el "pellet" en tampón TM 3 veces.

MATRICES NUCLEARES AISLADAS EN CONDICIONES REDUCTORAS CON 40mM DTT

En este procedimiento las matrices nucleares obtenidas según el procedimiento anterior se reducen con 40 mM DTT (TABLA VII).

Las 4 primeras extracciones son, por tanto, idénticas al proceso anterior, el "pellet" de matrices nucleares se resuspende en tampón LM y se añade lentamente el mismo volumen de tampón que contiene 4M ClNa y 40 mM de DTT.

- a) Se incuban 20 min en hielo.
- b) Se centrifuga a 2.440 rpm y 4°C durante 20 min.
- c) Se lava el "pellet" en tampón TM 3 veces.

Todos los tampones llevan 1 mM de PMSF añadido justo antes de su uso para evitar la degradación proteolítica. Después de cada una de las extracciones se recogieron alícuotas de los diferentes fracciones para su análisis en microscopía óptica, electrónica y electroforesis.

5. CONTROL DE LA ELIMINACION DEL ADN Y ARN EN LOS SUCESIVOS PASOS DE LA EXTRACCION MEDIANTE FLUORESCENCIA

La eliminación del ADN y ARN en los sucesivos pasos de la extracción de las

matrices se monitorizó usando DAPI para la fluorescencia de ADN y PIRONINA para la fluorescencia de ARN.

PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Las alícuotas de núcleos y matrices nucleares se fijaron en paraformaldehído al 0.3% en tampón fosfato pH 7 durante 30 min y a la temperatura ambiente.

Después de centrifugación a 2.440 rpm y 4°C durante 20 min, se tomaron alícuotas de los "pellets", se extendieron en portaobjetos haciendo frotis y se dejaron secar.

Las incubaciones sucesivas con DAPI y PIRONINA se hicieron sobre los portaobjetos de la forma siguiente:

- a) Tinción con DAPI a una concentración de 2 $\mu\text{gr/ml}$. en H_2O destilada a pH 7.5, durante 5 min en oscuridad.
- b) Lavado en tampón fosfato.
- c) Tinción sucesiva con PIRONINA a una concentración 5×10^{-5} M en H_2O destilada, durante 5 min. en oscuridad.
- d) Lavado con alcohol de 70°C y secado.
- e) Se monta la preparación con "antifading" y se sella el cubreobjetos con esmalte transparente.

OBSERVACION DE LA FLUORESCENCIA DE LAS MUESTRAS

Las preparaciones se observaron en un FOTOMICROSCOPIO ZEISS equipado

con una lámpara de mercurio de alta presión HB050. Los filtros utilizados para la visualización de la fluorescencia constan de un filtro de excitación para seleccionar la longitud de onda de excitación, un divisor cromático y un filtro de supresión acoplados (TABLA VIII).

Se obtuvieron fotografías de las muestras, haciendo tomas del mismo campo, en contraste de fase y con los 2 tipos de fluorescencia, utilizando un objetivo NEOFLUAR (40) y película de alta sensibilidad TRi-X (27 -DIN) (400 ASA).

PREPARACION DEL "ANTIFADING"

a) Preparación del tampón carbonato/bicarbonato

SOL A - CO_3HNa 1M

SOL B - CO_3Na_2 1M

76.8 ml Sol A y 7.74 ml Sol B en un volumen final de 1l.

Se diluye para reducirlo a 0.5 M

Se disuelven 10 mgr. de p-fenilendiamina en 10ml de PBS, se agita durante 2 min en oscuridad y sobre hielo.

Se añaden 90 ml de glicerol.

Se ajusta el pH a 8 con el tampón carbonato/bicarbonato.

b) Preparación del PBS

ClNa80 gr.

ClK 2gr.

PO_4HNa_2 11,5 gr.

$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 2 gr.

Se disuelve en último lugar el PO_4HNa_2 .

Se enrasa al final a 1 l. con H_2O destilada y desionizada.

6. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA

6.1 METODOS DE FIJACION

FIJACION CON GLUTARALDEHIDO

Preparación del glutaraldehido

El glutaraldehido se prepara al 3% en el momento de su empleo, a partir de una solución comercial al 25% (TAAB), diluyendo con tampón cacodilato 0.025 M pH 7.2 conteniendo Cl_2Mg 5 mM.

Método de fijacion

Se resuspende el "pellet" en glutaraldehido al 3%.

Se incuba 15 min en hielo.

Se centrifuga a 2.440 rpm. y 4°C durante 20 min.

Se hacen 2 lavados en tampón cacodilato 0.025 M conteniendo Cl_2Mg 5 mM.

INCLUSION EN AGAR

Después de los lavados con cacodilato, se retira el sobrenadante y se seca

cuidadosamente el tubo de centrífuga con papel de filtro.

Se añade sobre el "pellet" Agar al 2% calentado al baño maría. Se remueve con una aguja enmangada y se deja enfriar sobre hielo. Después se separa el Agar del tubo con la aguja, y se corta en porciones de aproximadamente 1-2 mm. Estas porciones se lavan en un pocillo de fijación con cacodilato 0.025 M durante 1 hora y media cambiando el tampón cada media hora.

POST-FIJACION CON TETROXIDO DE OSMIO

Esta post-fijación se realiza exclusivamente en muestras para preparación convencional y tinción con Acetato de uranilo y citrato de plomo, pero se omite en las tinciones citoquímicas e inmunocitoquímicas.

Preparación del ácido ósmico

Se debe preparar 24 horas antes de su empleo, en campana extractora de la siguiente forma:

Se lavan en mezcla sulfocrómica durante 1 hora una varilla de vidrio gruesa, una probeta y un frasco de boca ancha con tapón esmerilado.

Se coge una ampolla de medio gramo de tetróxido de osmio, se raspa la etiqueta y se hace una hendidura con la lima para luego fracturarla. Se introduce en agua caliente y posteriormente en agua fría para que el tetróxido de osmio cristalice sobre las paredes de la ampolla. Seguidamente se introduce ésta en el frasco que contiene la mezcla sulfocrómica y se deja durante unos minutos con objeto de que el cristal de la ampolla quede bien limpio. Se aclaran ambos, junto con la varilla, con H₂O destilada y

desionizada durante 2 horas.

La varilla se calienta al rojo a la llama y con ella se rompe la ampolla dentro del frasco. Se añaden 25 ml de agua destilada, y se disuelve bien el tetróxido de osmio, que al romperse la ampolla queda fijado a las paredes de ésta y al fondo del frasco. Obtenemos así una disolución de ácido ósmico al 2 %. Esta solución se diluye a partes iguales con un tampón cacodilato 0,05 M, resultando una solución final de tetróxido de osmio al 1 %.

Método de fijación

Las muestras incluidas en Agar, se cubren con la solución 1% de ácido ósmico y se desgasifican en una campana conectada a una bomba de vacío (1 Atm) y se fijan a presión normal durante 1 hora. A continuación se lavan las muestras con cacodilato 0.025 M durante 1 hora y media cambiando el tampón cada media hora.

FIJACION EN PARAFORMALDEHIDO

Esta fijación se utiliza para las reacciones inmunocitoquímicas.

Preparación del paraformaldehido

Se prepara una disolución de paraformaldehido al 4% en tampón PBS calentado previamente a 60°C, se deja decantar durante algunos minutos. Una vez enfriada la disolución se disuelve el precipitado añadiendo NaOH 1N gota a gota, hasta que la disolución se vuelva transparente. Finalmente se ajusta a pH 7.3.

Debido a la toxicidad del paraformaldehído la preparación debe hacerse en campana extractora.

Método de fijación

Se redisuelve el "pellet" en paraformaldehído al 4% . Se fija a 4°C durante 2 horas.

Se centrifuga a 2.440 rpm y 4°C durante 20 min.

Se lava el "pellet" en PBS 3 horas.

FIJACION PARA LA TECNICA DE BISMUTO

Preparación del glutaraldehído

El glutaraldehído se prepara al 6% en el momento de su empleo, a partir de una solución comercial (TAAB) al 25% diluyendo con tampón cacodilato 0.025M, a pH 7.2 conteniendo Cl_2Mg 5 mM.

Método de fijación

Se resuspende el "pellet" en glutaraldehído al 6%.

Se incuba 15 min en hielo.

Se centrifuga a 2.440 rpm a 4°C durante 20 min.

Se hacen 2 lavados en tampón cacodilato 0.025 M conteniendo Cl_2Mg 5 mM.

6.2. DESHIDRATACION

DESHIDRATACION PARA INCLUSION EN RESINAS EPOXI

Una vez fijado el material, se extrae el agua del mismo usando como disolvente intermedio deshidratador etanol, en una serie de mayor a menor dilución.

Los "pellets" estuvieron en cada uno de los alcoholes los siguientes tiempos a temperatura ambiente.

Alcohol de 30º 1 hora

" 50º "

" 70º noche

" 90º 1 hora

" 100º..... "

" 100º..... "

" 100º..... "

DESHIDRATACION PARA INCLUSION EN RESINAS ACRILICAS

Para incluir en resinas acrílicas las deshidrataciones en alcohol se realizan a 4ºC y la serie de alcoholes que se utiliza es la siguiente:

Alcohol de 30º 1 hora

"	50º	"
"	70º	noche
"	90º	30 minutos
"	100º	"
"	100º	"
"	100º	"

6.3. INCLUSION

INCLUSION EN RESINAS EPOXI

Se utilizó la resina de Spurr (ERL4206) (comercializada por TAAB) para las preparaciones convencionales de muestras.

Preparación de la resina

Conviene trabajar en un ambiente sin humedad para que la polimerización no se altere, para ello se pasa por la llama todo el material de vidrio que vaya a estar en contacto con la resina.

La resina se prepara inmediatamente antes de su uso utilizándose los siguientes componentes.

Para preparar 10 ml de Spurr:

ERL 4206 2.23 ml

DER 736 1.33 ml

NSA 6.30 ml.

Se mezclan estos tres componentes en un erlenmeyer con un agitador magnético y luego se añade el acelerador.

S-1 0,13 ml

Se vuelve a agitar la mezcla. Esta una vez preparada tiene una vida media de 48 h.

Método de inclusión

Primero se procede a una infiltración de la resina en el material utilizando mezclas de alcohol y resina en concentraciones crecientes de ésta:

Etanol 100º + resina (1:1) -- 90 min. T.ambiente

" " (1:3) -- " "

Resina -- " "

Resina -- noche

Preparación de las mezclas y polimerización de la resina

Se utilizaron cápsulas de gelatina de 0.5 ml de capacidad que fueron puestas 30 minutos antes de su uso en una estufa a 70ºC para eliminar cualquier resto de humedad. Primero se puso una gota de Spurr en ellos, introduciendo después el "pellet" incluido en Agar, orientandolo de manera adecuada y rellenando la cápsula con Spurr.

La polimerización se realizó a 70ºC durante 8 horas como mínimo en una estufa de

polimerización REICHERT.

INCLUSION EN RESINAS ACRILICAS

Se utilizó la resina acrílica LR White (London Resin) (Newman y col. 1982) para las reacciones citoquímicas e inmunocitoquímicas.

La resina viene preparada comercialmente y puede usarse directamente mezclándola en proporciones adecuadas con alcohol de 100º para la infiltración.

Se procede por tanto a una infiltración de la resina en el material, utilizando mezclas de alcohol y resinas a las siguientes proporciones:

Alcohol 100º + LR White (2:1) -- 3 h a 4ºC

" " (1:2) -- 6 h a 4ºC

LR White -- 3 h a 4ºC

Continúa la infiltración durante la noche en nevera. Al día siguiente se realizan varios cambios de LR-White cada hora.

Preparación de las piezas y polimerización de la resina

Se utilizaron cápsulas de gelatina de 0'5 ml de capacidad, calentadas previamente para eliminar restos de humedad. Se pone una gota de LR-White en ellas, introduciendo después el "pellet" y rellenando la cápsula con la resina.

En éste caso es absolutamente necesario cerrar la cápsula después de llenarla, para evitar que la resina entre en contacto con el aire, de lo contrario no polimeriza.

La polimerización se efectuó durante 22 horas a 50ºC en la estufa de inclusión.

6.4. REALIZACION DE CORTES ULTRAFINOS PARA OBSERVACION AL MICROSCOPIO ELECTRONICO

TALLADO DE LAS MUESTRAS

Previamente a la realización de los cortes hay que localizar en la pieza la zona que interesa y tallar sobre ella una pirámide. Para ello se utilizó un Pyramitone LKB 11.800. Se coloca la cápsula con la inclusión en un soporte de Piramitón. Utilizando cuchillas de vidrio de 55º, se orienta la pieza, se aproxima a la cuchilla, comenzandose a tallar el frente.

Progresivamente vamos haciendo sobre el frente cortes semifinos de 2µm, que montamos en un portaobjetos con una gota de agua y ponemos a calentar en una platina a 40º.

Cuando se ha evaporado completamente el agua, se monta con una gota de Euparal y un cubreobjetos, y lo observamos al microscopio óptico en contraste de fase.

Localizada la zona que nos interesa, se talla sobre la pieza un tronco de pirámide en cuya base se procura centrar la zona del frente seleccionada. Para ello se tallan los lados de pirámide de manera que la base forma un trapecio.

Control al microscopio óptico

Las matrices o los núcleos en las sucesivas etapas de extracción se estudian al microscopio óptico en los cortes semifinos preparados. Las microfotografías correspondientes se efectuaron en un fotomicroscopio ZEISS con objetivos de contraste

de fase, utilizando una película Plus X(21DIN) (100 ASA).

PREPARACION DE LAS REJILLAS

Las rejillas portamuestras utilizadas fueron de 3 mm de ϕ y 75 ó 300 mallas, de cobre para las preparaciones convencionales y de níquel para las reacciones inmunocitoquímicas. Las rejillas llevan sobre su cara mate una película de pioloformo.

Preparación de la película de pioloformo

La solución de pioloformo se preparó al 0,8 % en cloroformo. Es necesario dejar estabilizar la solución 24 horas antes de su uso.

Para preparar la película, se introduce un portaobjetos durante un par de segundos en la solución de pioloformo y se deja secar al aire la película sobre el portaobjetos.

Se recuadra la película con una cuchilla, y con cuidado se introduce el portaobjetos inclinado en una cubeta con agua destilada, de manera que la película se vaya despegando y quede flotando en la superficie del agua.

Las rejillas se depositan sobre la película con unas pinzas y por su lado mate.

Para recoger la película, se extiende un papel de filtro recortado sobre ella, y una vez empapado en agua y antes de que se hunda, se extrae de la cubeta con las pinzas, quedando la película con las rejillas adheridas a él. Se deja secar en estufa a 30°C durante unas horas.

Antes de utilizar las rejillas, se controla el estado de la película-soporte de pioloformo al microscopio óptico.

REALIZACION DE CORTES ULTRAFINOS

Las cuchillas empleadas tanto para el tallado como para la realización de cortes ultrafinos, se obtienen con un aparato de fabricar cuchillas LKB 780/A. El vidrio que se va a utilizar debe ser lavado y desengrasado antes de la fabricación de las cuchillas. Una vez tallada la pirámide se coloca la pieza en un soporte del ultramicrotomo ULTRACUT REICHERT JUNG, con la base mayor hacia abajo. Para realizar los cortes, se monta sobre la cuchilla una balsa con cinta adhesiva, sellada con parafina, y se llena de agua destilada y filtrada, aquí es donde quedaran flotando posteriormente los cortes.

La cuchilla con la balsa montada, se coloca en un soporte del ultramicrotomo y se procede a enfrentar la pieza y el filo de la cuchilla, de modo que la base mayor de la pirámide, quede paralela al filo, en la zona donde la cuchilla (previamente examinada) no presente estrías. A continuación se llena la balsa con agua bidestilada, buscando en la superficie de esta un buen reflejo, luego se procede a la aproximación de la pieza a la cuchilla, hasta que coinciden en una linea el borde de la pirámide y el filo de la cuchilla. En este momento, se procede a cortar, conectándose en primer lugar, el mando de los cortes semifinos, con un avance de $0,1\mu\text{m}$ para una mayor aproximación de la pieza, y en el momento que se observe en el agua el primer corte, se conecta el mando de los cortes ultrafinos. Los cortes forman tiras que quedan flotando en el agua. El grosor de los mismos se compueba por reflexión. Un corte de color plateado tiene un grosor adecuado de $50\text{-}70\mu\text{m}$. Las tiras de cortes se recogen por contacto en una rejilla.

6.5. TINCION CORTES ULTRAFINOS

TINCION CONVENCIONAL CON ACETATO DE URANILO Y CITRATO DE PLOMO

Tras el secado de la rejilla se procede a la tinción de los cortes que contiene.

Los cortes obtenidos de las preparaciones fijadas con glutaraldehído y post-fijadas con osmio, se contrastan sucesivamente con acetato de uranilo y citrato de plomo.

CONTRASTACION CON ACETATO DE URANILO

Preparación de acetato de uranilo

Se prepara una solución de acetato de uranilo al 5% en agua bidestilada y cuidando que no le dé la luz. Se centrifuga durante 30 min. a 3.000 rpm y a una temperatura de 4°C.

Método de tinción

Finalizada la centrifugación, se flotan las rejillas con los cortes hacia abajo en una gota de acetato de uranilo en los pocillos de tinción, de modo que el lado mate, donde están los cortes, quede en contacto con la solución.

Se tiñe 30 min. en oscuridad. Después se lavan las rejillas abundantemente y con cuidado en agua destilada y se secan sobre papel de filtro WHATMAN.

CONTRASTACION CON CITRATO DE PLOMO

Preparación del citrato de plomo

Para preparar 5 ml de disolución, empleamos:

Citrato de plomo	0,02 g
NaOH 10 N	0,05 gr
agua destilada	5 ml

Se hierve durante 15 min. un tubo de centrifuga con NaOH y agua destilada y en otro lugar se hierve tambien durante 10 min. agua destilada, dejándola enfriar, y en ella se lava el tubo de centrifuga anterior.

Se mezcla el citrato de plomo con los 5 ml de agua bidestilada en atmósfera de nitrógeno y se añaden los 0,05 ml. de NaOH 10 N. Se agita durante 5 min. y a continuación se deposita sobre la solución una capa de aceite de parafina con cuidado para que no se mezclen las fases.

Método de tinción

Antes de teñir, se centrifuga el citrato de plomo durante 10 min. a 3.000 rpm y 4°C.

En una placa Petri con un papel de filtro WHATMAN humedecido en el fondo, se coloca un trozo de película de parafilm donde colocaremos las gotas de citrato de plomo. Se coloca también dentro de la placa un vidrio de reloj con varias lentes de NaOH humedecidas. Se colocan las rejillas flotando sobre las gotas de citrato de plomo con los cortes hacia abajo y se tiñen durante 1-2 min. A continuación se lavan

abundantemente y con cuidado con agua destilada y se secan con papel WHATMAN.

CONTRASTACION EDTA PREFERENCIAL PARA RIBONUCLEOPROTEINAS

Las muestras que se van a contrastar con EDTA (Bernhard 1969) van fijadas exclusivamente en paraformaldehído, sin post-fijación con ácido ósmico.

Preparación de la disolución

Se disuelven 7,44 gr de EDTA en 50 ml. de agua destilada. En agitación constante, se van añadiendo gotas de NaOH 1N muy lentamente hasta que quede un poco de precipitado. Se ajusta a pH 7 con NaOH. A continuación se completa hasta 100 cc. con agua destilada. Hay que dejar estabilizar la disolución 24 horas antes de su uso.

Método de tinción

Primero se tiñen las rejillas con acetato de uranilo durante 10 min. según el método descrito anteriormente (6.5). Después se tratan con EDTA durante 45-90 min. y se secan. Finalmente, se contrastan con citrato de plomo 1 min. según se indicó anteriormente (6.5).

TINCION CON BISMUTO ESPECIFICA PARA GI.

Las muestras para estas preparaciones son fijadas con glutaraldehído al 6% que bloquea la unión inespecífica del bismuto a los grupos aminos, y no llevan post-fijación

con ácido ósmico; la inclusión se realizó en la resina LR-White.

La técnica de impregnación con Bismuto que hemos empleado está basada en la descrita por Brown y Locke (1978) para células animales.

Preparación de la solución de bismuto

Se prepara a partir de 2 soluciones:

SOLUCION A

Tartrato de sodio	400 gr.
Nitrato de bismuto	200 gr.
NaOH 1N	10 ml.

Se diluye el tartrato con NaOH, y la disolución resultante se añade gota a gota al nitrato de bismuto. Se guarda en nevera.

SOLUCION B

(TRA) Trietanolamina	2,983 gr.
Agua destilada	100 ml.

Resultando una solución de TRA 0,2 N que ha de ser neutralizada con ClH hasta pH 7.

En el momento de la tinción se mezclan:

1 parte de A

2 partes de B

Se procede a ajustar el pH, primero con ClH 5 N y finalmente con ClH 1 N hasta conseguir un pH entre 7 y 7,5. La solución final debe quedar transparente.

Método de tinción

Ponemos sobre una placa Petri un trozo de parafilm en el fondo y colocamos unas gotas de la solución anterior. En cada gota pondremos una rejilla con los cortes hacia la solución de bismuto.

Se tiñen durante 30 min. y después se lavan las rejillas abundantemente con agua destilada.

6.6. INMUNOLOCALIZACION DE ADN.

Las muestras utilizadas para la detección inmunocitoquímica del ADN se procesaron según se indicó anteriormente en los apartados (6.1), (6.2) y (6.3).

Anticuerpos utilizados

El anticuerpo primario utilizado es un monoclonal contra ADN de cadena doble y sencilla de células híbridas de ratón-ratón (clon AC-30-10). Pertenece a la clase de inmunoglobulinas IgM. Es un anticuerpo desarrollado por el Dr. Scheer (Scheer y col. 1987) disponible comercialmente a través de BOEHRINGER Mannheim Biochemica.

Especificidad: El anticuerpo reacciona contra ADN nativo y desnaturalizado aislado de varios organismos: ratón y timo de ternera, M13-SV40, Fd-ADN y otros plásmidos y también, contra ADN sintético de composición variada: poly[d(A-C)], poly[d(G-T)],

poly[d(A-T)], poly[d(A-T)] y poly[d(A-T)].

El anticuerpo secundario utilizado es un anti-IgM de ratón (específico de cadena μ), conjugado con oro (tamaño de partículas de 10 nm), de origen comercial (Sigma Chemical).

Reacción inmunocitoquímica

Las reacciones inmunocitoquímicas se efectuaron según una técnica post-inclusión, flotando sucesivamente las rejillas en las siguientes soluciones:

Lavado en PBS y Tritón-X 100 al 0,05 % durante 10 min. a temperatura ambiente.

Bloqueo de los posibles lugares inespecíficos de unión del anticuerpo primario, incubando las rejillas durante 20 min. y a temperatura ambiente en PBS conteniendo seroalbúmina bovina (BSA) al 5%.

Incubación de las muestras con el anticuerpo primario, a una concentración de 1 μ g/ml en un medio que contiene PBS y BSA al 0,1 %, durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda.

Los controles negativos se incubaron en gotas que contienen PBS con BSA al 0,1 %, pero no el anticuerpo primario.

Lavados a temperatura ambiente con PBS y Tritón X-100 al 0,05 % durante 10 min.

Incubación de las rejillas con el anticuerpo anti-IgM de ratón acoplado a oro diluido hasta 1:50 en un medio que contiene PBS, BSA al 0,1 %, Tween al 0,05 % y suero fetal al 5 % previamente filtrado.

Mantenemos las rejillas en incubación durante 30 min. a temperatura ambiente.

Lavados con PBS y Tritón X-100 al 0,05 %, 10 min.

Se lavan las rejillas con agua destilada y desionizada, 10 min. a temperatura ambiente.

Contrastación con acetato de uranilo al 5 % en solución acuosa, durante 5 min. en oscuridad.

Lavado de las rejillas con agua destilada desionizada, secado y observación al M.E.

6.7. OBSERVACION AL MICROSCOPIO ELECTRONICO

Las observaciones de microscopia electrónica se efectuaron indistintamente en un microscopio PHILIPS EM 300 o en un HITACHI 2000.

Las preparaciones convencionales se observaron a 80 KV con una apertura de objetivo de 50 nm. En el caso de las preparaciones de EDTA, oxinitrato de bismuto y reacciones inmunocitoquímicas las observaciones se hicieron a 60 KV con una apertura de objetivo menor (20 nm), para aumentar el contraste.

Las microfotografías se tomaron sobre placas de 60 x 90 mm marca DUPONT.

Los positivos fotográficos se realizaron sobre papel politenizado marca ILFORD utilizando una ampliadora LEITZ.

6.8 RECONSTRUCCION TRIDIMENSIONAL DE LAS MATRICES NUCLEARES A PARTIR DE CORTES SERIADOS

OBTENCION DE CORTES SERIADOS

Los cortes seriados se realizaron básicamente según la técnica descrita anteriormente, pero con la ayuda de una cuchilla de diamante DIATOME de 1.2 mm.

Una vez flotando sobre la balsa, las tiras de cortes se fraccionaron en segmentos de varios cortes de forma que cupieran en la ranura de las rejillas, con la ayuda de un cabello montado en un palillo y con sumo cuidado para no perder ninguno de los cortes.

Cada una de estas tiras de cortes se recogió con la ayuda de un anillo de Marinozzi y se depositó con su gota de agua sobre un soporte de aluminio, que presenta agujeros del diámetro de las rejillas, y que previamente se había recubierto con una película soporte de pioloformo. Sobre la gota de agua se coloca la rejilla de ranura con ayuda de una lupa binocular, de forma que la tira de cortes quede englobada en la ranura de la rejilla y se deja secar el agua.

Este proceso se repite ordenadamente en todos los segmentos de las tiras de cortes hasta completar la estructura que se quiere estudiar.

Una vez secos todos los cortes se rompen los bordes del pioloformo alrededor de las rejillas con ayuda de una micropipeta de cristal afilada, y se separan las rejillas que llevan montadas las tiras de cortes sobre pioloformo, guardandolas ordenadamente de la primera a la última.

Los cortes se contrastan con acetato de uranilo y citrato de plomo según la técnica convencional descrita anteriormente (6.5).

OBSERVACION AL MICROSCOPIO ELECTRONICO

Las rejillas se observaron en un microscopio HITACHI 2000 que permite rotación electromagnética de la imagen, lo que facilitó la orientación de las imágenes sucesivas

de una misma estructura en las fotografías.

Después de localizar en los cortes las matrices nucleares que se iban a estudiar, se tomaron fotografías de las mismas a 6000 aumentos, que constituyeron la base del estudio posterior.

OBTENCION DE LOS PERFILES DE LAS ESTRUCTURAS

Una vez clasificadas ordenadamente las fotografías de los cortes seriados correspondientes a cada estructura, se reproducen los perfiles de las mismas sobre una lámina de acetato con diferentes colores, utilizando dos puntos de referencia para orientar cada corte respecto del anterior.

Se elige el número de estructuras que se quieren estudiar, en nuestro caso:

Lámina nuclear residual

Matriz interna

Nucleolo residual

El contorno de cada estructura se dibuja en una lámina de acetato con un color distinto.

Previamente se señalan 2 puntos de referencia en la fotografía del corte al microscopio electrónico que nos van a servir de eje en cada reproducción de imagen.

Los bordes de la lámina de acetato se hacen coincidir con los bordes de la fotografía y se transmiten con un rotulador los 2 puntos del eje situados en la fotografía a la lámina de acetato.

A continuación se señala en la lámina el perfil de cada estructura con su color propio.

Se coge otra lámina de acetato, se situa encima de la anterior y se calcan sobre ésta los 2 puntos que nos van a seguir sirviendo de eje.

Se toma la fotografía siguiente. Se pone debajo de la lámina nueva donde se va a reproducir la próxima imagen. Se hacen coincidir los bordes y se señala la nueva estructura, tomando como guía la estructura de la lámina anterior.

Se repite este proceso con todas las fotografías que se quieran analizar.

TRANSMISION DE LOS PERFILES AL ANALIZADOR DE IMAGEN Y CONSTRUCCION DEL ESTEREOPAR

Los perfiles de las estructuras se procesaron en un ordenador IBAS I utilizando un programa de reconstrucción tridimensional 3D REC de KONTRON BILDANALYSE Gmb + 1, y luego se analizaron en un analizador semiautomático de imagen KONTRON IBAS.

El programa 3D REC consta de:

- Un programa RC REC para recibir datos a partir de perfiles delineados sobre un tablero digitalizador.
- Un programa RC ROT para rotación de coordenadas alrededor de cualquier eje (x, y o z).
- Un programa RC PLT para dibujar con salida de datos a un "plotter" TEWI DATA PL

Utilizando el programa RC REC se introducen en el ordenador los siguientes datos:

- 1-Perfiles de las estructuras con su eje de referencia.
- 2-Distancia real de los dos puntos del eje de referencia en micras: $2,62 \mu\text{m}$.
- 3-Distancia en profundidad de cada corte con respecto al siguiente: $0,07 \mu\text{m}$.
- 4-El número de puntos que debe registrar el ordenador por cada 10 cms: en nuestro caso, 50 puntos.

Una vez introducidos los datos en el programa RC REC, se construyen los perfiles citados utilizando el programa RC ROT. Los estereopares obtenidos fueron rotados 5° alrededor del eje y.

A continuación se utiliza el programa RC PLT para dibujar el estereopar con el "plotter", que dibuja primero el archivo de datos original introducido y luego el rotado.

6.9 CUANTIFICACION MORFOMETRICA

La cuantificación morfométrica de los diámetros de las fibras y los gránulos se efectuó sobre los positivos fotográficos correspondientes al microscopio electrónico. Se tomaron como muestra 15 núcleos residuales diferentes en cada estadio de extracción, y en el caso de las matrices, 15 matrices diferentes obtenidas en cada uno de los experimentos. Se calculó la media aritmética para cada uno de los diámetros de las estructuras.

7. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA ELECTROFORESIS SDS-PAGE

Las alícuotas de núcleos y de las distintas fracciones obtenidas en las diferentes extracciones, se lavaron en tampón TM conteniendo 1 mM PMSF. Se congelaron y mantuvieron a -20°C .

7.1 DETERMINACION DE LAS PROTEINAS

La determinación de la cantidad de proteínas de las muestras se realizó según el método de Lowry y col. (1951), según se detalla a continuación:

PREPARACION DE REACTIVOS DE LOWRY

Se preparan 4 soluciones:

A. CO_3Na_2 al 2% en NaOH 0.1 N.

B. $\text{SO}_4\text{Cu}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.5% en tartrato sódico al 1%. Esta solución debe prepararse en el momento de ser utilizada porque precipita con facilidad en unas horas.

C. Se mezclan 25 ml. de A y 0.5 ml. de B. Esta solución sólo dura 24 horas.

D. Se diluye una preparación de Folin Ciocalteus (Merck) en proporción 1:2 en agua destilada..

CURVA PATRON Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Para construir la curva patrón de absorbancia en el espectrofotómetro se utilizaron

una serie de disoluciones, partiendo de una solución de BSA en agua destilada al 0.03 %.

Se ponen volúmenes crecientes de esta disolución en una serie de 9 tubos, cuya cantidad de proteína es por tanto conocida:

TUBOS	VOLUMEN BSA 0.03%	CANTIDAD DE BSA
Blanco	0	0
1	0.1 ml	30 μ gr
2	0.2 ml	60 μ gr
3	0.3 ml	90 μ gr
4	0.4 ml	120 μ gr
5	0.5 ml	150 μ gr
6	0.6 ml	180 μ gr
7	0.7 ml	210 μ gr
8	0.8 ml	240 μ gr
9	0.9 ml	270 μ gr

Posteriormente se añade reactivo C hasta 2 ml en cada tubo, se agitan y se dejan actuar 10 minutos.

Se añade a cada uno de ellos 0.2 ml de Folin diluido en proporción 1:2, se agita y se deja reaccionar durante 20-30 minutos.

Se prepara también otra serie de tubos con las proteínas que se quieren determinar. Para ello se diluyen las muestras liofilizadas de núcleos o matrices nucleares en un volumen de 0.5 ml. en agua destilada y se toma 0.1 ml. de cada una de las muestras diluidas para efectuar la valoración.

PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Se llenan los tubos con agua destilada a un volumen final de 1 ml.

Se añade a cada uno de ellos 2 ml. de reactivo C, se agita bien y se deja actuar 10 minutos.

Después se añade 0.2 ml. de Folin diluido en proporción 1:2, se agita y se deja actuar de 20 a 30 minutos.

LECTURA EN EL ESPECTROFOTOMETRO

Los valores de absorbancias se leen a una longitud de onda de 550 nm en un

espectrofotómetro SPECTRONIC 710 (Bausch & Lomb).

OBTENCION DE LA CURVA PATRON Y VALORACION DE LAS PROTEINAS

Obtención de la curva patrón

La curva patrón se construye representando en ordenadas los valores de absorbancia medidas en cada uno de los tubos de la serie de dilución de BSA, y en las abscisas la cantidad de proteína ya conocida.

Determinación de las proteínas

Utilizando la curva patrón y a partir de los datos de la absorbancia medidos se obtiene en abscisas la cantidad de proteína que contiene cada tubo, y a partir de ella la concentración de proteína total de cada muestra.

Conocido el peso seco de la muestra, el porcentaje de proteína en peso seco se obtiene por reglas de 3 simples.

7.2 ELECTROFORESIS

Para la separación electroforética de las proteínas nucleares y de la matriz residual así como para la determinación de sus Pms se empleó el sistema descrito por Laemmli (1970), utilizando una concentración de acrilamida al 10%.

POLIMERIZACION DE LOS GELES

Equipo utilizado

Para la electroforesis se utilizó una cubeta de electroforesis Protean II Slab Cell (Bio-Rad) con placas de 16 cms y espaciadores de 1 mm de grosor, y una fuente de alimentación LKB Bromma.

Composición del gel de separación

Acrilamida 9.79 %

Bisacrilamida 0.26 %

Se utilizan:

Agua destilada	16.3 cc
Tris ClH 1.5 M pH 8.8	10 cc
SDS al 20%	0.2 cc
Acril-Bis al 30 %	13.4 cc
Persulfato amónico 10%	0.1 cc
TEMED	0.02cc

Composición del gel de concentración

Acrilamida 3.79 %

Bisacrilamida 0.10 %

Se utilizan:

Agua destilada	16.3 cc
Tris ClH 0.5M pH 6.8	2.5 cc
SDS al 20%	0.05 cc
Acril-Bis al 30%	1.3 cc

Persulfato amónico 10% 0.05 cc

TEMED 0.005 cc

Las soluciones se degasifican en trompa de vacío durante 15-20 minutos.

Primero se polimeriza el gel de separación protegido del aire con una capa de isobutanol. Cuando ha polimerizado se retira el isobutanol, se lava varias veces con agua destilada y desionizada, se seca el interior de las placas.

Después se polimeriza el gel de concentración sobre el gel de separación, protegido del aire con el peine de electroforesis.

DISOCIACION DE LA MUESTRA

Las proteínas se desnaturalizaron mediante tratamiento con un tampón de disociación que contiene mercaptoetanol y SDS.

La composición del tampón de disociación es la siguiente:

Mercaptoetanol al 15% (v/v)

SDS al 9% (p/v)

Tris ClH 0.2 M pH 6.8

Y se colorea con azul de bromofenol al 0.01% (p/v)

Las muestras conteniendo 100 μ gr de proteína total se desnaturalizaron en 150

μ l de dicho tampón, calentándolas en baño de agua a 100°C durante 10 minutos.

Una vez disociadas se les añade sacarosa al 60% hasta alcanzar una concentración final del 30%, con el fin de aumentar su densidad.

Como proteínas patrones se utilizaron las "standard" de rango bajo de Pm comercializadas por Bio-Rad que contienen:

Fosforilasa A de músculo de conejo	97.4 KD
BSA	66.2 KD
Ovoalbúmina de gallina	42.699 KD
Anhidrasa carbónica bovina	31 KD
Inhibidor de la tripsina de soja	21.5 KD
Lisozima de pollo	14.4 KD

La cantidad utilizada de proteína en cada una de las bandas patrones fué de 10 μ gr.

ELECTROFORESIS DE LA MUESTRA

Las muestras se corrieron a una corriente constante de 20 mA por placa en el gel de concentración y a 40 mA por placa en el de separación, hasta que el azul de bromofenol alcanzó el final del gel.

El tampón de electrodos utilizado contiene 0.025M Tris, 0.192 M glicina y SDS al 0.1%

COLORACION DE LOS GELES CON AZUL DE COOMASIE R250

Una vez terminada la electroforesis, los geles se tiñeron durante la noche en una solución de azul de Coomasie en agitación constante y se destiñeron con la solución decolorante durante 3 horas, renovando la solución cada hora.

Preparación de la solución azul de Coomasie

La solución colorante se prepara a partir de 2 soluciones previas:

- Solución A: 60 gr de tricloroacético en 800 ml de agua destilada.
- Solución B: se mezcla la solución A en 200 ml de metanol y 70 ml de ácido acético.

Para la solución colorante final se mezclan:

400 ml de la solución B

10 ml de agua destilada y desionizada con Coomasie Blue al 1%

Preparación de la solución decolorante

Se mezclan:

6 volúmenes de metanol

14 volúmenes de agua destilada y desionizada

2 volúmenes de ácido acético.

DETERMINACION DE PESOS MOLECULARES DE LAS PROTEINAS

El cálculo de los Pms relativos de las bandas se hizo según el método Weber y Osborn (1969), basado en la proporcionalidad directa existente en los geles de poliacrilamida-SDS entre la movilidad electroforética y el Pm.

La movilidad electroforética de cada banda proteica se calcula mediante un cociente entre la distancia recorrida por la banda proteica y la distancia recorrida por el frente de electroforesis.

Cálculo del Pm

Con los datos de movilidad electroforética y Pms de las bandas patrones se construye la recta patrón, representando en ordenadas los Pms de las proteínas patrones y en abscisas las movilidades electroforéticas correspondientes.

Con los datos de movilidad electroforética de nuestras proteínas, obtendremos los correspondientes Pms sobre la recta patrón. El margen de error estimado para éste método es de un 5-10 %

RESULTADOS

1. ULTRAESTRUCTURA DEL NUCLEO "in situ" y aislado EN CELULAS MERISTEMATICAS DE *Allium cepa*.

1.1 ORGANIZACION ESTRUCTURAL DEL NUCLEO "in situ"

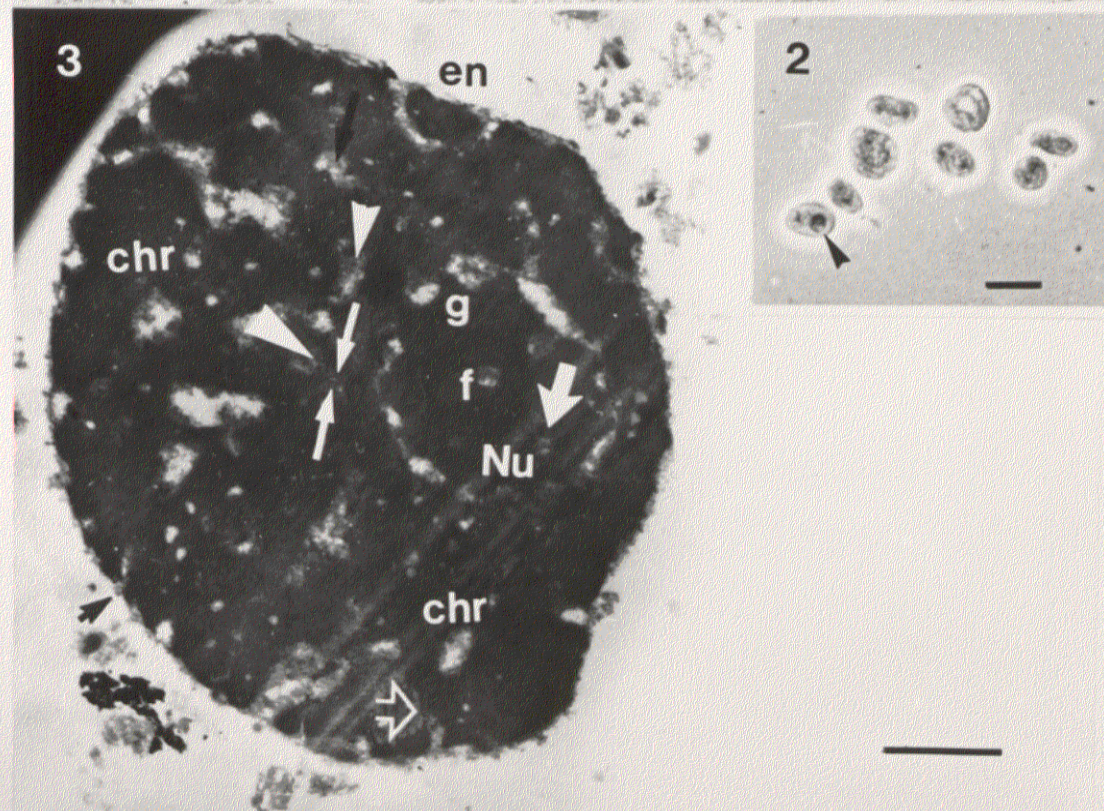
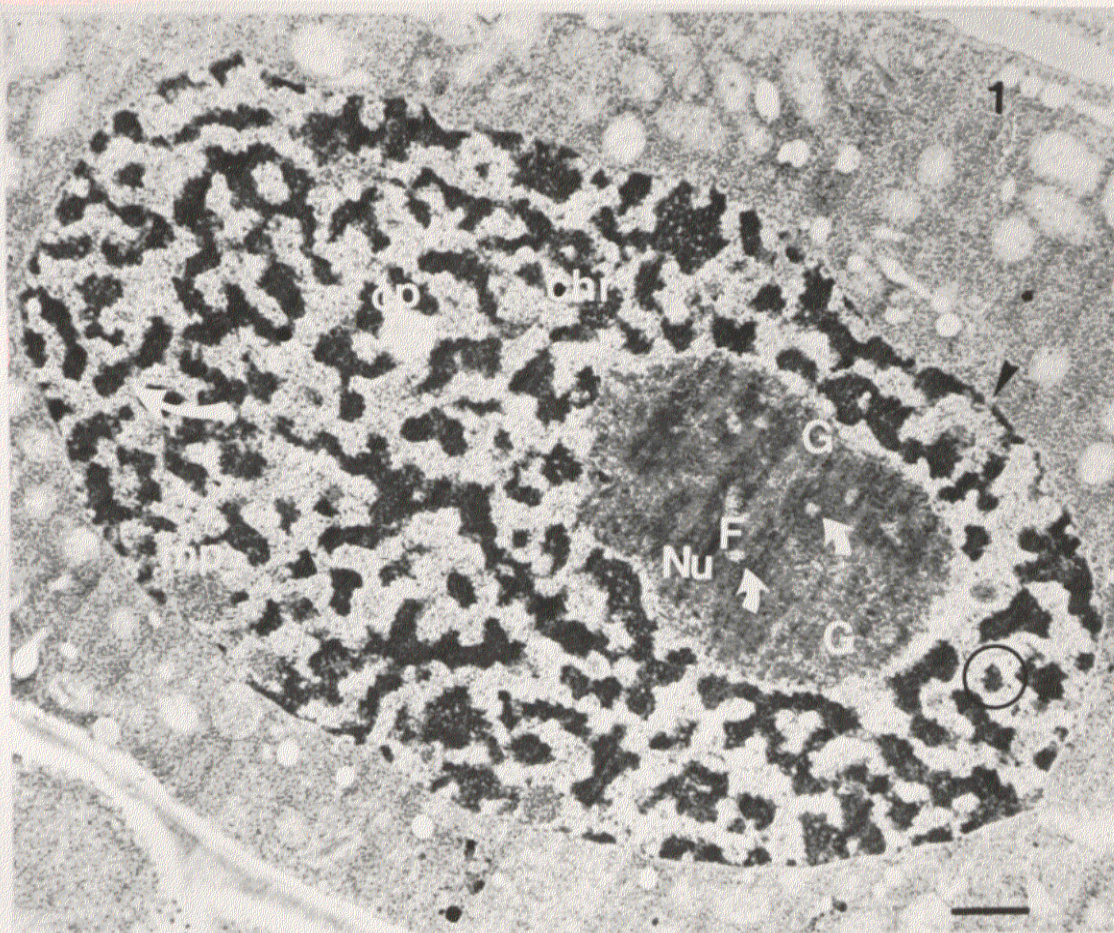
En secciones ultrafinas de células meristemáticas interfásicas, fijadas en glutaraldehído-osmio y teñidas con acetato de uranilo-citrato de plomo, el núcleo muestra una forma circular o elipsoidal de aproximadamente 10μ de diámetro.

Desde un punto de vista estructural, se distinguen 4 regiones o componentes del núcleo con estructuras y funciones bien diferenciadas (Fig. 1): la envuelta nuclear, que limita al núcleo separándolo del citoplasma; y en el interior del mismo, el nucleolo, las masas de cromatina condensada y las regiones intercromatínicas.

La envuelta nuclear. Está formada por una estructura de doble membrana con un espacio interior que separa las dos membranas, denominado espacio perinuclear, el cual es transparente a los electrones y mide en este material aproximadamente 45 ± 5 nm en grosor.

La membrana externa presenta ribosomas asociados y, en ocasiones, puede observarse una continuidad del espacio perinuclear con las cisternas del retículo endoplásmico rugoso.

La envuelta nuclear está atravesada por los poros nucleares que aparecen como estructuras complejas, densas a los electrones, de 90-100 nm de diámetro. En secciones tangenciales puede apreciarse su estructura en anillo con el gránulo central osmiófilo (fig. 1).



El nucleolo. Es la estructura más patente del núcleo de células interfásicas. Presenta una forma esférica con un diámetro medio de 5 μm y en él se distinguen tres componentes típicos con una localización definida:

- Centros fibrilares.** Aparecen en número variable dependiendo de la actividad biosintética nuclear. Contienen la cromatina nucleolar transcripcionalmente inactiva asociada con proteínas. Pueden ser homogéneos o heterogéneos. En el primer caso aparecen como áreas claras compuestos de fibrillas de 10 nm de diámetro y en el segundo caso presentan además inclusiones de cromatina condensada en su interior (Fig 1).

- El componente fibrilar denso,** cuyas masas rodean los centros fibrilares. Está formado por fibras de 7-9 nm de diámetro y contiene los genes ribosómicos transcripcionalmente activos y es también el soporte del procesamiento temprano de las partículas de RNPr (Fig 1).

- El componente granular,** entremezclado con la región fibrilar. Está compuesto por gránulos de 15-20 nm de diámetro asociados a fibras de aproximadamente 10 nm de grosor. Contiene las partículas preribosómicas (Fig 1).

Masas de cromatina condensada. En especies reticuladas como es *Allium cepa* las masas de cromatina condensada son las estructuras más patentes del núcleo después del nucleolo. Se extienden por todo el interior nuclear, proporcionándole un aspecto reticulado. Presentan perfiles irregulares y conexiones entre sí. Las masas periféricas se adosan a la envuelta nuclear pero nunca en los lugares donde se localizan los poros nucleares. Están formadas por fibrillas de 20 nm de diámetro (Fig. 1).

En este material no existen masas de cromatina perinuclear ni perinucleolar como sucede en animales.

Región intercromatínica. Contiene las regiones de cromatina descondensada en transcripción activa y las partículas correspondientes a las RNPhn y RNPsn. Se localiza entre las masas de cromatina condensada y presenta una cierta correspondencia morfológica y topológica con las regiones de la matriz nuclear interna.

Su estructura es compleja y difícilmente observable a no ser en preparaciones de EDTA que contrastan específicamente las ribonucleoproteínas (Fig.4). Se puede dividir para facilitar su estudio en región pericromatínica y región intercromatínica propiamente dicha.

Región pericromatínica. Es la zona que rodea la cromatina condensada y es el área más activa en transcripción del núcleo exceptuado el nucleolo. En esta región aparecen las fibrillas y los gránulos pericromatínicos.

-Las fibrillas pericromatínicas, se observan como un borde irregular en la periferia de la cromatina condensada, tienen un diámetro variable entre 3-20 nm.

-Los gránulos pericromatínicos miden 35-45 nm de diámetro y están rodeados por un halo claro de 25 nm. Aparecen en el borde de las masas de cromatina y ocasionalmente en el interior de estas.

Región intercromatínica. Se localiza a continuación de la zona anterior y en conexión con ella. En la región intercromatínica se encuentran:

-Fibrillas intercromatínicas. Son formas intermedias entre las fibrillas y los gránulos pericromatínicos. Contienen ARNhn en procesamiento.

-Gránulos intercromatínicos, de 20-25 nm de diámetro. Aparecen asociados a fibras de 3-4 nm y distribuidos por los espacios intercromatínicos formando una red. Al contrario de lo que ocurre en células animales no forman grandes grupos (Fig.7). Los G.I son difíciles de observar en las preparaciones convencionales (Fig.1) pero se contrastan específicamente con la tinción con oxinitrato de bismuto (Fig.7).

Además de la red de fibras y gránulos que componen la región intercromatínica se pueden observar también varios cuerpos nucleares de estructura bien definida. Los más típicos son:

- "coiled bodies". Son cuerpos esféricos compactos, cuyo diámetro máximo medio es $0.4 \pm 0.15 \mu\text{m}$. Están formados por fibras espiralizadas de 15-25 nm de diámetro que presentan continuidad con las masas de cromatina y con las estructuras del espacio intercromatínico (Fig.1).

-Cuerpos fibrilares. Presentan una densidad electrónica muy baja y tienen forma redondeada o elipsoide. Están formadas por fibrillas helicoidales de 10 nm. A veces se presentan asociadas a las masas de cromatina condensada, aunque pueden estar libres en la región intercromatínica. Están rodeados por un halo transparente a los electrones (Fig.1).

-Micropuff. Corresponden a las estructuras centroméricas interfásicas de plantas reticuladas, son de forma elipsoidal con ejes de $0.83 \mu\text{m}$ y $0.63 \mu\text{m}$ de diámetro. Están formados por una malla fibrilar cuyas fibras miden 25-30 nm de diámetro. Esta malla, a su vez, se encuentra inmersa en una matriz proteica de 5-7 nm de diámetro. Están asociados con las masas de cromatina condensada (Fig 1).

1.2 ORGANIZACION ESTRUCTURAL DEL NUCLEO AISLADO.

Después del aislamiento, los núcleos teñidos en vivo con verde de métilo-acético, muestran al microscopio óptico una buena preservación estructural (Fig. 2). Retienen su morfología de conjunto y aparecen con poca contaminación citoplásmica. Las estructuras nucleares más claramente discernibles son los nucleolos densos, y las masas de cromatina condensada que proporcionan al núcleo un aspecto ligeramente reticulado.

En secciones ultrafinas de núcleos aislados, convenientemente procesados y observados al M.E., se comprueba la preservación estructural y topológica de sus 4 componentes principales: envuelta nuclear, nucleolo, masas de cromatina condensada y regiones intercromatínicas (Fig. 3).

Sin embargo, las características ultraestructurales observadas en los núcleos aislados, varían ligeramente dependiendo de los métodos de fijación utilizados.

FIJACION EN GLUTARALDEHIDO AL 3% , POST-FIJACION EN ACIDO OSMICO AL 2%, E INCLUSION EN RESINA EPOXI.

Envuelta nuclear. Conserva su estructura típica en la que se reconocen los poros complejos. (Fig. 3). Estos tienen un diámetro aproximado de 80 nm en secciones tangenciales en las que se observa el elemento central osmiófilo.

Masas de cromatina condensada. Son bastante densas a los electrones y están aparentemente expandidas, mientras que las regiones intercromatínicas están reducidas de tamaño en relación al núcleo "in situ". (Figs.1 y 3). Se puede observar la organización fibrilar homogénea de las masas de cromatina condensada, constituida por fibras de cromatina de 7-10 nm de diámetro (Fig. 18).

Nucleolo. Aparece como una estructura compacta en los núcleos aislados. Sus tres componentes principales: centros fibrilares, componente fibrilar denso y componente granular, presentan la misma distribución que en el núcleo "in situ". Los centros fibrilares muestran una estructura similar a los del nucleolo "in situ", están rodeados por

el componente fibrilar denso y en la periferia se localiza el componente granular (Fig. 3).

Región intercromatínica. Es la más afectada en su organización estructural tras el aislamiento nuclear. Aparece formada por una red de fibrillas de baja densidad electrónica y aproximadamente 5 nm de diámetro (Figs. 3 y 18), conectadas con las masas de cromatina. A la red de fibrillas se asocian dos tipos de gránulos: unos con un diámetro de 40-45 nm y otros de diámetro menor 25-30 nm (Figs.3 y 18). A veces, presentan su estructura parcialmente relajada, lo que permite observar las fibras arrosariadas que los forman.

En los bordes de la cromatina condensada se reconocen los gránulos pericromatínicos de 40 nm de diámetro rodeados por un halo transparente, estos gránulos no parecen afectados en su estructura (Fig. 3); observándose también numerosas fibrillas pericromatínicas de grosor variable entre 3-20 nm (Fig 3).

FIJACION EN GLUTARALDEHIDO AL 6%, SIN POSTFIJACION EN ACIDO OSMICO E INCLUSION EN RESINA ACRILICA.

Cuando los núcleos se fijan en glutaraldehído al 6%, sin post-fijación en ácido ósmico y se incluyen en resinas acrílicas para la realización de pruebas citoquímicas, no se observan modificaciones fundamentales en su estructura (Fig 7).

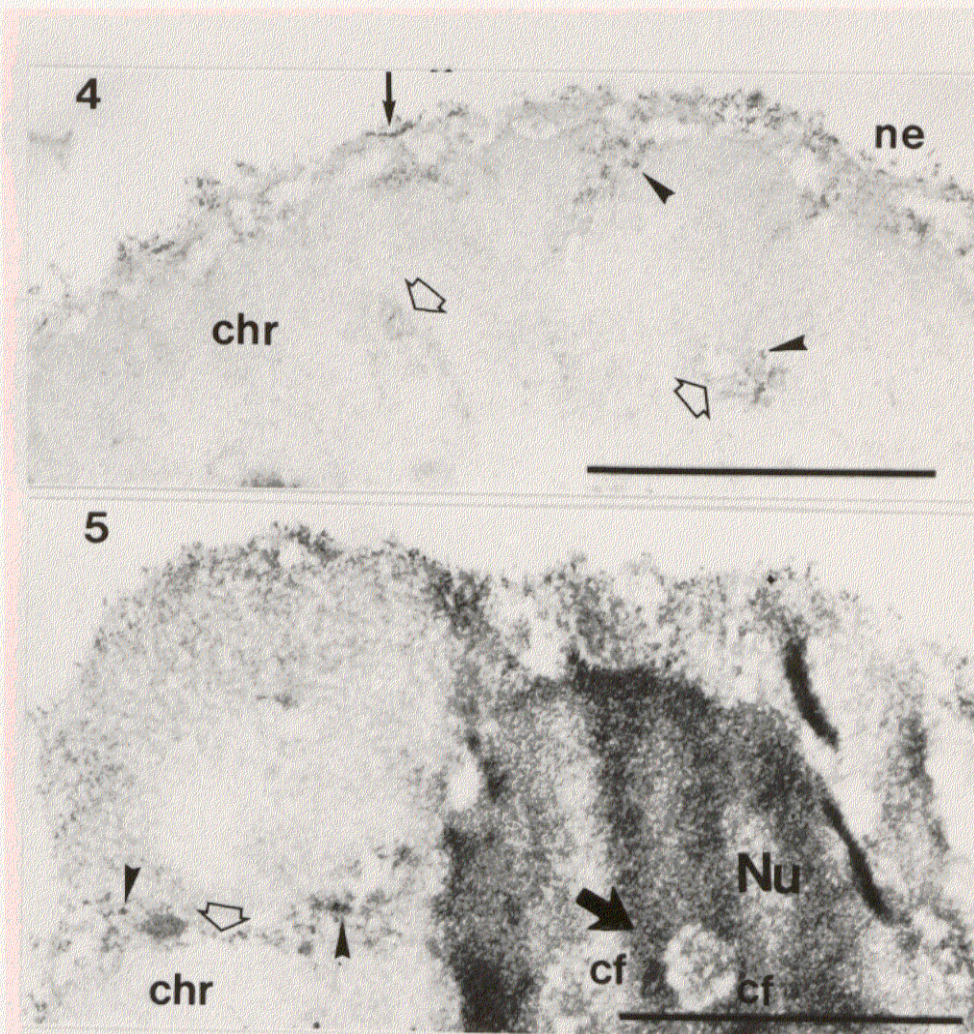
FIJACION EN PARAFORMALDEHIDO AL 4%, SIN POST-FIJACION CON ACIDO OSMICO, E INCLUSION EN RESINA ACRILICA.

La fijación en paraformaldehído al 4%, sin post-fijación en ácido ósmico y posterior inclusión en la resina acrílica LR White, sí produce diferencias ultraestructuralmente significativas en los núcleos aislados (Fig.4). En primer lugar, en todos los componentes nucleares aparecen más individualizadas las fibras que los constituyen, perdiéndose la observación de los componentes amorfos. La envuelta nuclear se encuentra adosada a las masas de cromatina y es difícil de observar. Las masas de cromatina condensada aparecen menos densas que el nucleolo, y resultan difíciles de distinguir de los elementos fibrilares de las regiones intercromatínicas, en las que destacan los gránulos densos de 25-30 nm y 40-45 nm respectivamente (Fig 5). El nucleolo es la estructura más semejante en ambos tipos de fijaciones (Fig 5).

TINCION PREFERENCIAL PARA RIBONUCLEOPROTEINAS

Los núcleos aislados, fijados en paraformaldehído y teñidos con EDTA, presentan blanqueadas las masas de cromatina condensada mientras que los nucleolos (a excepción de los centros fibrilares) y ciertas estructuras de las regiones intercromatínicas aparecen preferencialmente contrastadas (Figs.4 y 5).

En las regiones intercromatínicas, la tinción de EDTA destaca los gránulos de 40-45 nm y 25-30 nm, así como fibras de grosor variable de 5-7 nm que se observan adosadas a los bordes de la cromatina condensada o bien en el interior de la región intercromatínica (Figs. 4 y 5). La envuelta nuclear no se contrasta, pero presenta polirribosomas fuertemente contrastados en su capa externa. Algunas veces se observa,



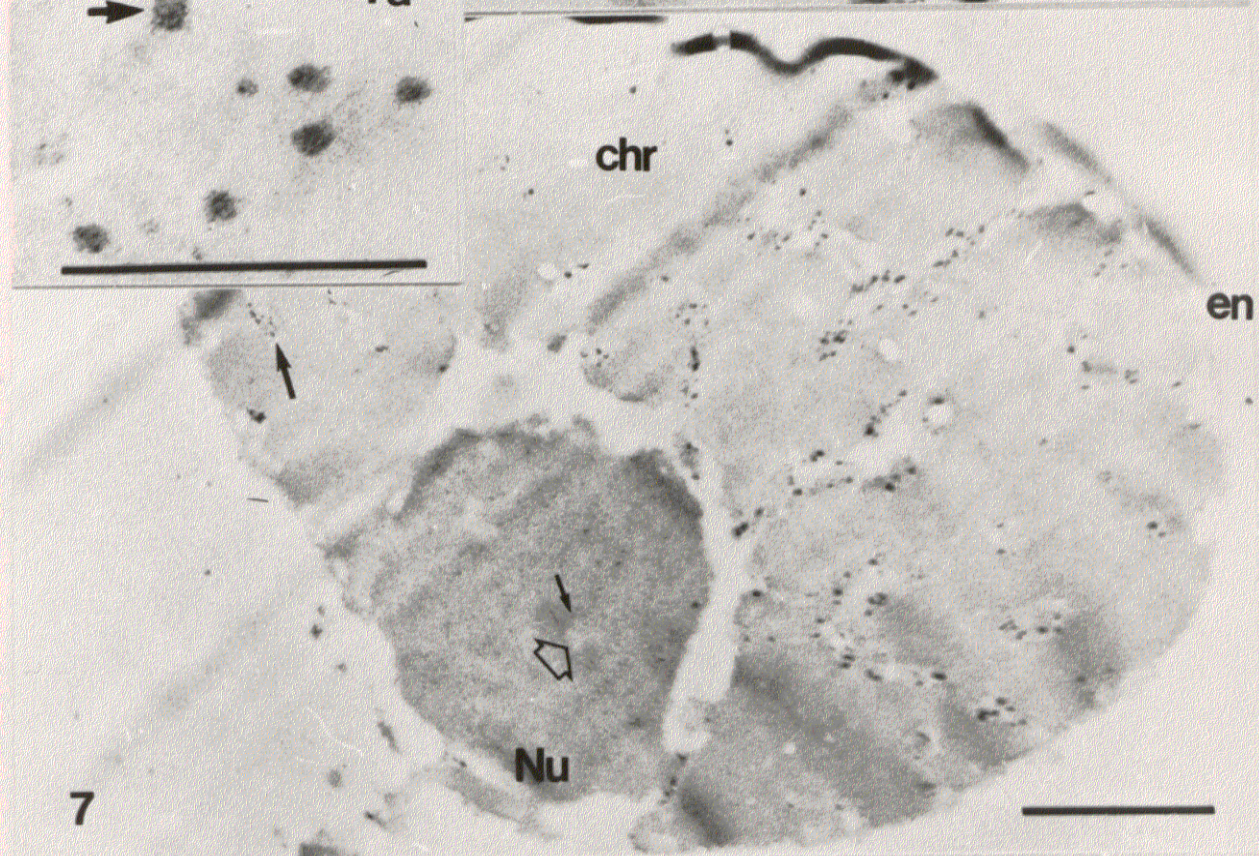
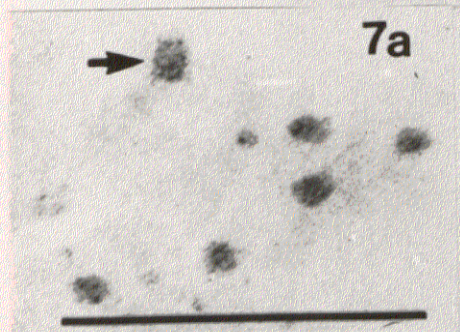
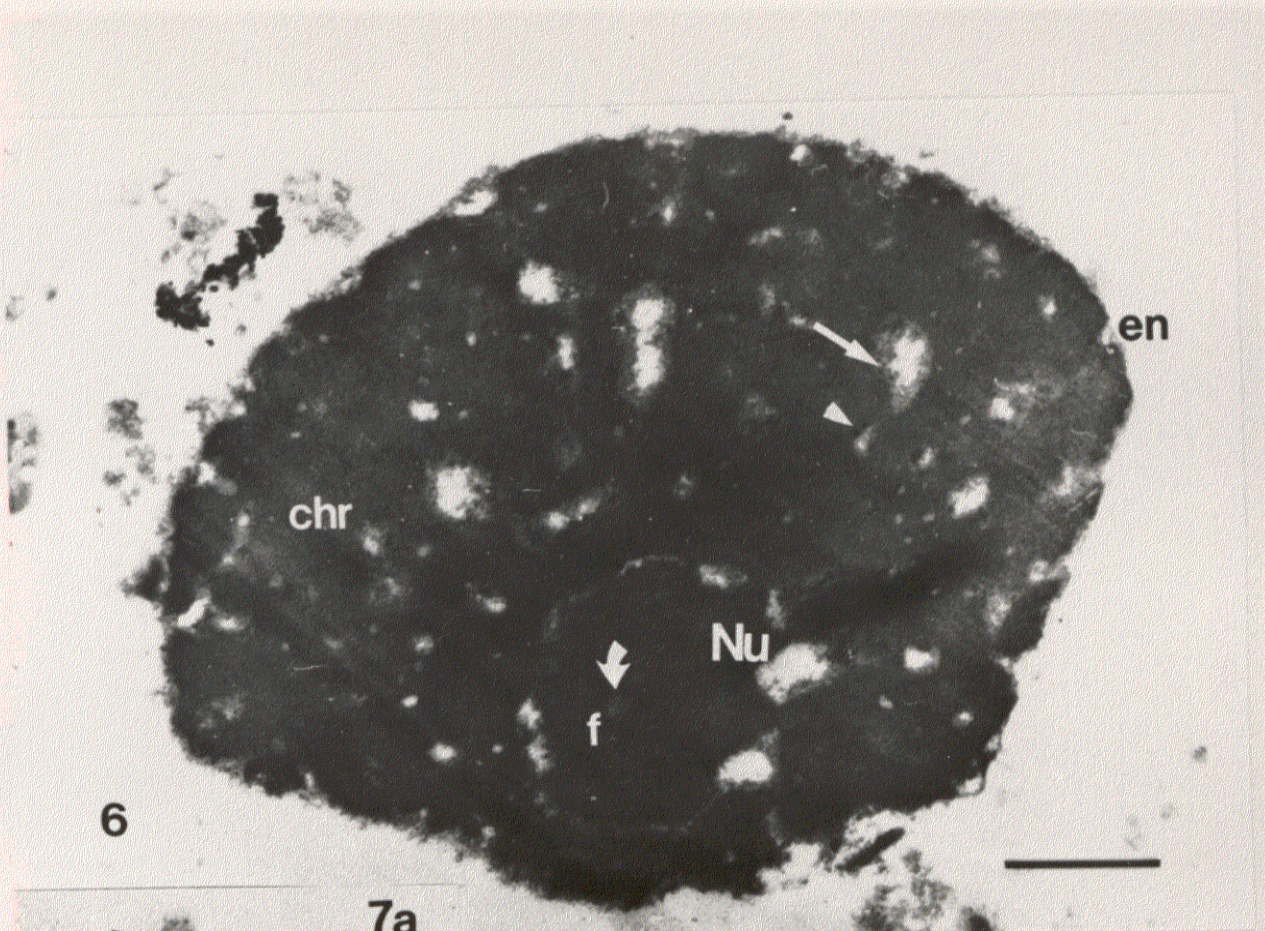
adosada a la superficie interna de la envuelta nuclear, una fina capa de fibras contrastadas. Estas fibras conectan con las estructuras ribonucleoproteicas de las regiones intercromatínicas.

TINCION CON OXINITRATO DE BISMUTO.

La tinción con bismuto muestra una gran selectividad. Los núcleos aislados, fijados en glutaraldehído e impregnados con oxinitrato de bismuto, presentan como únicas estructuras contrastadas los gránulos de 25-30 nm de las regiones intercromatínicas y ciertas fibras localizadas en el componente fibrilar denso del nucleolo. Debido a la ausencia de tinción en el resto de los componentes nucleares, hemos recurrido a positivos forzados de exposición para facilitar la identificación de dichos componentes.

Las masas de cromatina condensada y la envuelta nuclear se hallan desprovistas de tinción (comparar Figs. 6 y 7). En el nucleolo, la reacción presenta una intensidad mucho menor que en las regiones intercromatínicas. Los centros fibrilares aparecen como áreas claras sin teñir y situadas en el componente fibrilar denso, a su alrededor aparecen de forma discontinua, fibras de aproximadamente 4 nm realzadas por la tinción de bismuto. En general, la periferia del nucleolo correspondiente al componente granular así como las vacuolas nucleolares no presentan tinción con bismuto (Fig 7).

En las regiones intercromatínicas, las únicas estructuras contrastadas son gránulos de 25-30 nm. Estos gránulos están formados por fibras de ≈ 4 nm (Fig 7a).



2. MATRIZ NUCLEAR OBTENIDA POR EL METODO DE BEREZNEY Y COFFEY (1974) (Proc.I)

2.1 MORFOLOGIA Y ULTRAESTRUCTURA

Cuando se someten los núcleos aislados a extracción secuencial con tampones de baja concentración de magnesio, alta fuerza iónica (2M ClNa), detergentes no iónicos y digestión exhaustiva con nucleasas según el método clásico desarrollado por Berezney y Coffey (1974) (TABLA V), las estructuras residuales que se obtienen constituyen la matriz nuclear. La matriz nuclear final está constituida por tres componentes morfológicos principales: lámina, nucleolo residual y matriz interna (Fig. 8).

La lámina se observa como una capa continua en la parte más externa de la matriz, con una estructura fibrilar compleja formada por fibras de 10 nm y en la que se encuentran integrados los poros complejos residuales (Fig. 9).

La matriz interna es un entramado de masas fibrilares que se extienden por el interior de la matriz desde el nucleolo residual hasta la lámina. Está formada por fibras de 10-20 nm a las que se asocian gránulos de 25-30 nm (Fig. 10).

El nucleolo residual presenta una estructura densa, exclusivamente fibrilar con fibras de 15-20 nm. En su interior se observan zonas menos densas a los electrones, similares a los centros fibrilares en los que se distinguen fibras claras de aproximadamente 10 nm de diámetro (Fig. 10).

2.2 COMPOSICION POLIPEPTIDICA

Se ha analizado la composición polipeptídica de la matriz nuclear así como de los

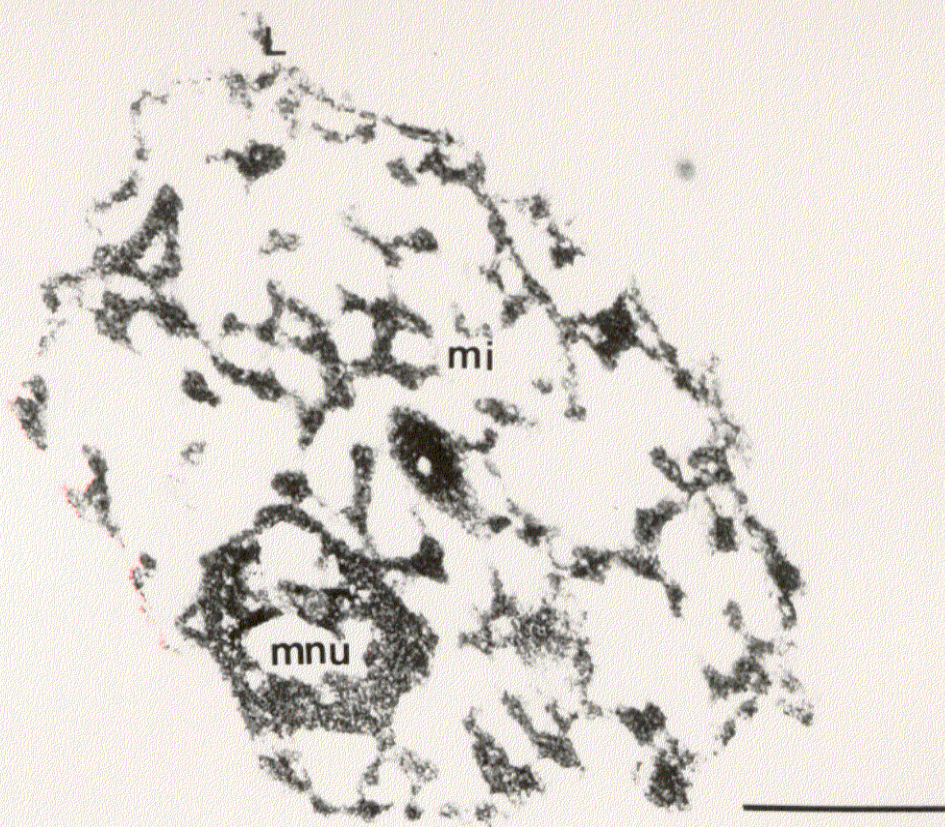
MATRIZ NUCLEAR OBTENIDA POR EL PROCEDIMIENTO DE BEREZNEY Y COFFEY (1974) (PROC I).

FIG.8 Matriz nuclear fijada en glutaraldehido-osmio y contrastada con acetato de uranilo-citrato de plomo. En ella se distinguen los tres componentes matriciales: Lámina (L), matriz interna (mi), y matriz nucleolar (mnu). x27.588. La barra indica 1 μ m

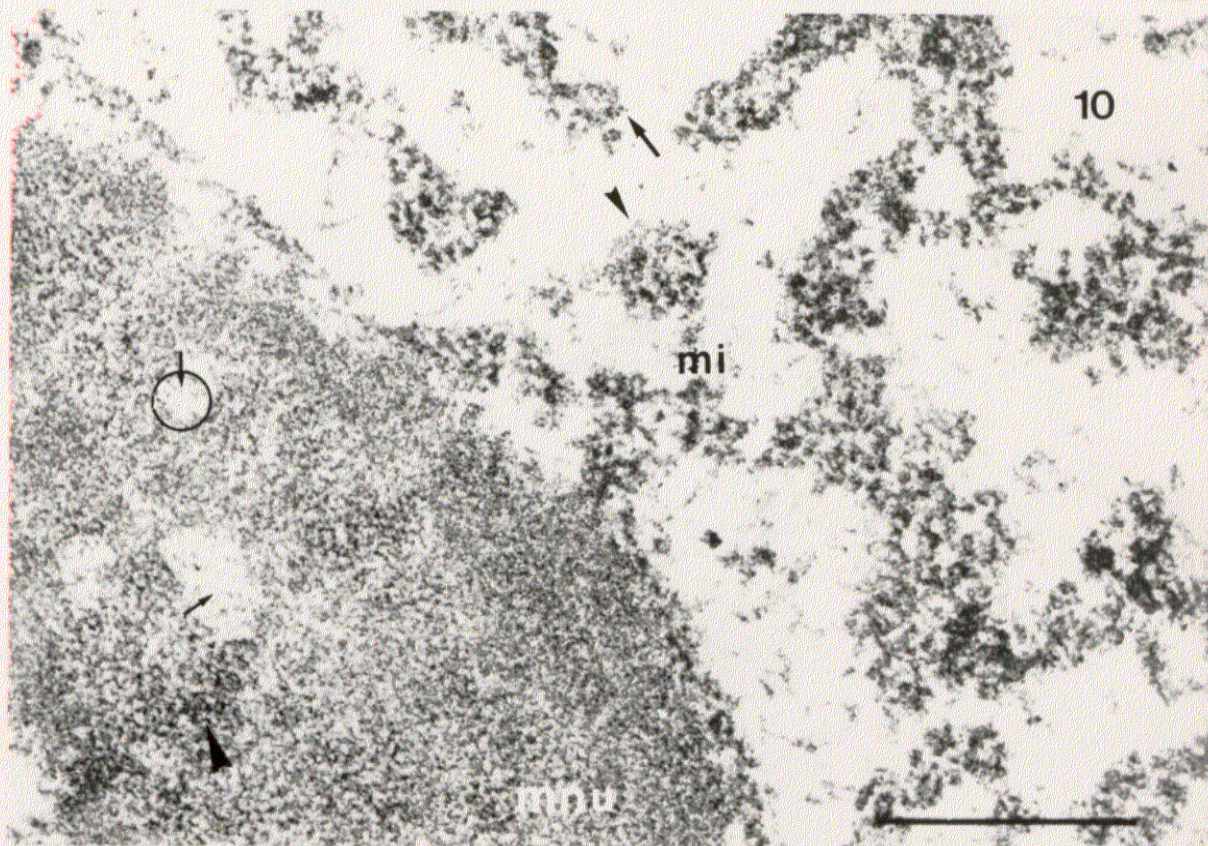
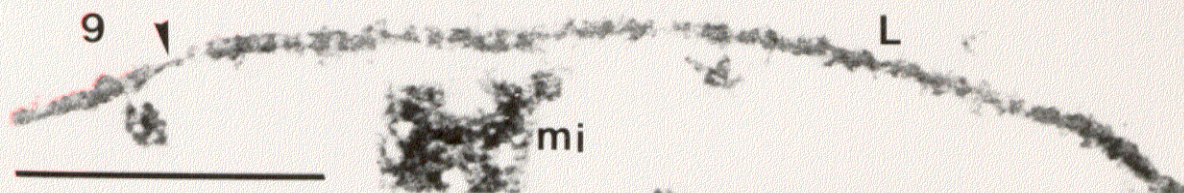
FIG.9 Detalle a mayor aumento de la lámina (L). Está formada por fibras de 10 nm y en ella se encuentran integrados los poros complejos (punta de flecha), matriz interna (mi).x40.470. La barra indica 1 μ m

FIG.10 Detalle a mayor aumento de la matriz interna (mi) y de la matriz nucleolar (mnu). La matriz interna está constituida por fibras de 10 nm (punta de flecha) a las que se asocian gránulos de 25 nm (flecha). La matriz nucleolar (mnu) es exclusivamente fibrilar con fibras de 15-20 nm (punta de flecha grande), y presenta áreas menos densas a los electrones similares a los centros fibrilares (círculo). En su interior se localizan fibras claras de 10 nm (flechas negras pequeñas). x34.200. La barra indica 1 μ m

8



9



núcleos residuales obtenidos en cada estadio de extracción, efectuando electroforésis monodimensionales de cada una de las fracciones proteicas nucleares.

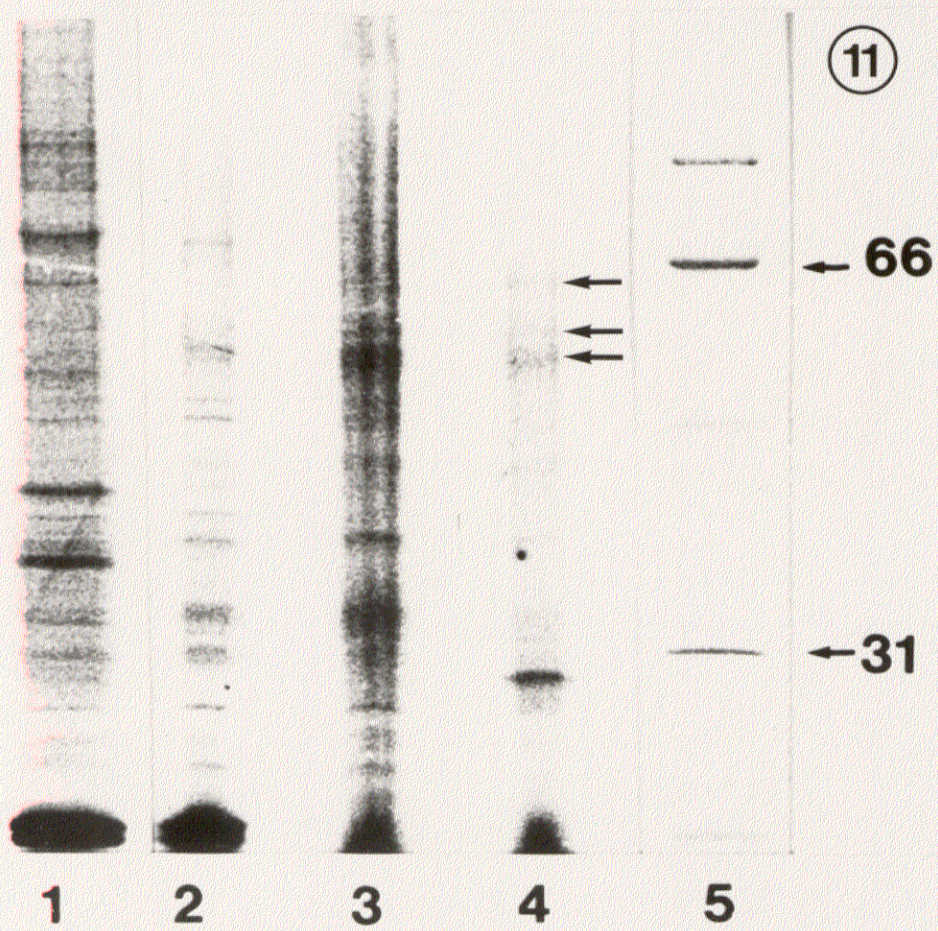
El perfil electroforético de los núcleos aislados es muy heterogéneo, se detectan numerosas bandas proteicas (aproximadamente 23) con Pms comprendidos entre 137 y 17 KD, siendo las bandas más prominentes las de 19 y 17 KD, y en menor grado las bandas proteicas situadas a 41, 34 y 71 KD (Fig.11, carrera 1).

La extracción en tampón de baja fuerza iónica (0.2 mM $\text{Cl}_2 \text{Mg}$) modifica el perfil electroforético de los núcleos, solubilizando principalmente las bandas de 41 y 34 KD. En esta fracción las bandas más prominentes siguen correspondiendo a las de 19 y 17KD, realzándose otras bandas proteicas situadas a 63 KD y las comprendidas entre 54-50 KD (Fig.11, carrera 2) que son componentes que aparecen posteriormente en la fracción correspondiente a la matriz nuclear (Fig.11, carrera 4). Asimismo son abundantes en esta fracción bandas proteicas situadas a 71 KD, 68 KD, 45 KD, 43 KD, 37 KD, 30 KD y 28 KD que ya aparecían en los núcleos.

La extracción en alta fuerza iónica (2M ClNa) solubiliza gran parte de las bandas proteicas de 19-17 KD y de las situadas a 71 y 68 KD observándose las bandas matriciales de 63 KD y las comprendidas entre 54-50 KD. Sigue siendo significativa de esta fracción la banda proteica de 37 KD (Fig.11, carrera 3).

Las digestiones enzimáticas con DNasa I y RNasa A que conducen a la fracción de matriz nuclear producen un perfil polipeptídico sencillo. Las proteínas matriciales se detectan a 63 KD y en el rango 54-50 KD (bandas a 54, 52 y 50 KD) aunque son también características las bandas de 37 y 27 KD (Fig.11, carrera 4). El perfil

FIG.11 COMPOSICION POLIPEPTIDICA DE LA MATRIZ NUCLEAR Y DE LAS SUCESIVAS FRACCIONES RESIDUALES OBTENIDAS POR EL METODO DE BEREZNEY Y COFFEY (1974), en geles SDS-PAGE al 10 % teñidos en azul de Coomasie. 1.Núcleos .2.Fracción nuclear residual obtenida por extracción en 0.2 mM acetato magnésico. 3.Fracción nuclear residual obtenida por extracciones sucesivas en 0.2 mM acetato magnésico y 2M ClNa. 4.Matriz nuclear. 5.Marcadores de Pm. Las flechas en la carrera 4 indican las bandas proteicas entre 63-50 KD comunes en las matrices nucleares obtenidas en todos los tratamientos.



polipeptídico de la matriz nuclear es mucho más sencillo que el de los núcleos aislados. Las bandas que lo componen no son mayoritarias en los núcleos, pero van haciéndose predominantes en las fracciones a lo largo de las sucesivas extracciones.

3. MATRIZ NUCLEAR OBTENIDA REALIZANDO LAS DIGESTIONES CON NUCLEASAS ANTES DE LA EXTRACCION SALINA. (Proc II)

Las extracciones utilizadas para la obtención de estas matrices son básicamente las mismas del procedimiento descrito por Berezney y Coffey (1974) pero en este caso se invierte el orden de la secuencia de las mismas (TABLA VI)). Los núcleos son sometidos primero a extracción con Tritón X-100, posteriormente digeridos con DNasa I y RNasa A; extraídos en medio de baja concentración de Magnesio (0.2 mM Cl_2Mg) y finalmente en medio de alta fuerza iónica (2M ClNa).

3.1 CONTROL DE LA ELIMINACION DEL ADN POR FLUORESCENCIA

Para controlar la eliminación del ADN a lo largo de la secuencia de extracción, los núcleos procedentes de las distintas extracciones se incubaron con DAPI y se observaron en un microscopio de fluorescencia a 365 nm.

Los núcleos aislados aparecen como esferas brillantes de color violeta, excepto las áreas de los nucleolos (Fig.12a, 12b); la extracción posterior con Tritón X-100 no altera este modelo de fluorescencia (Fig.13a, 13b); sin embargo, después de digestión con DNasa I la fluorescencia disminuye drásticamente (Fig.14a y 14b) y en la matriz nuclear final no se detecta prácticamente fluorescencia indicando que se ha producido una eliminación eficiente del ADN (Fig.15a y 15b).

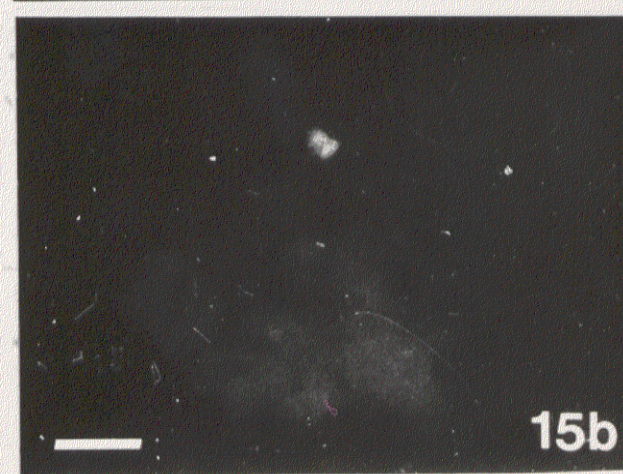
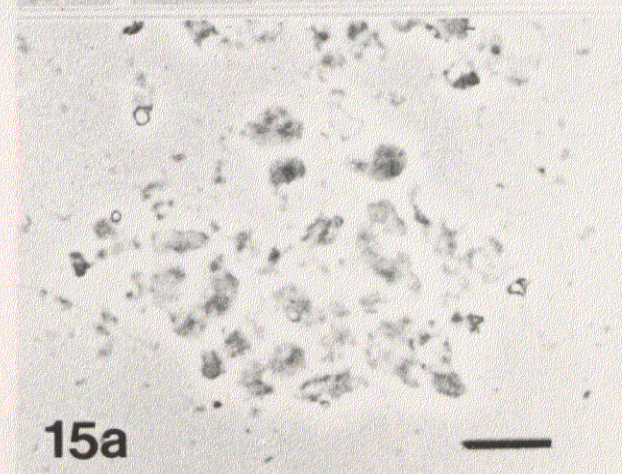
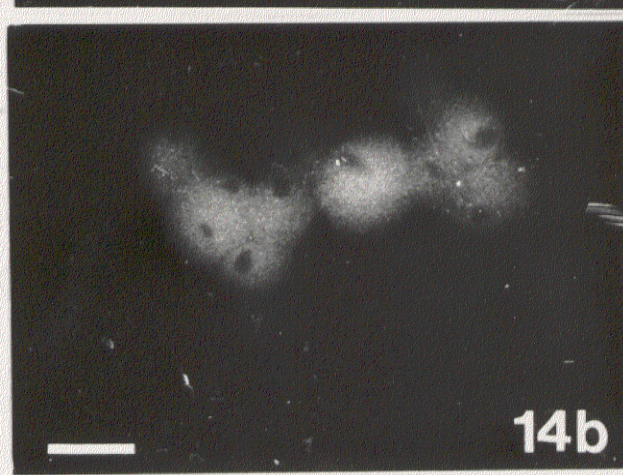
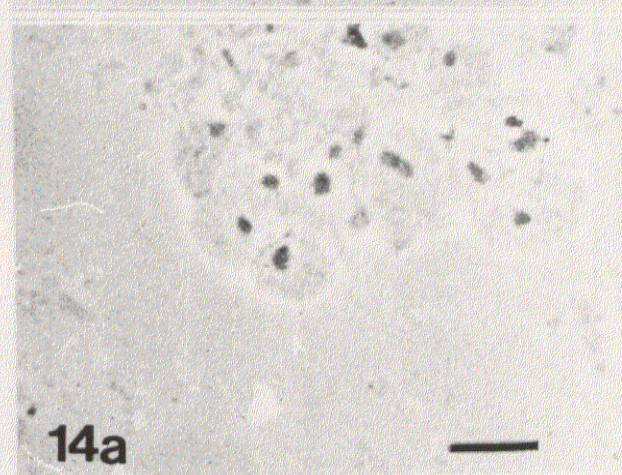
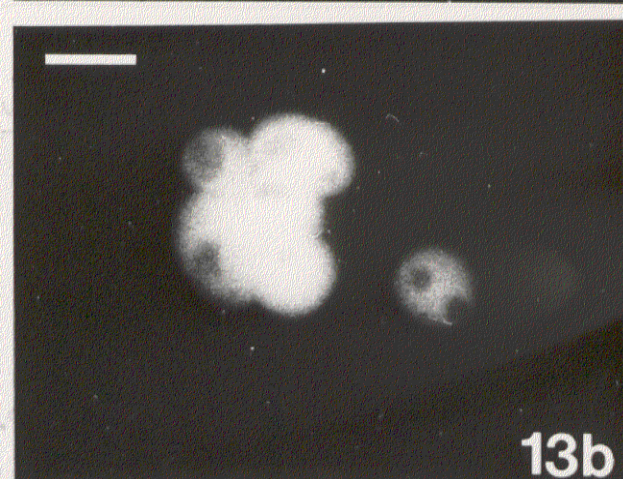
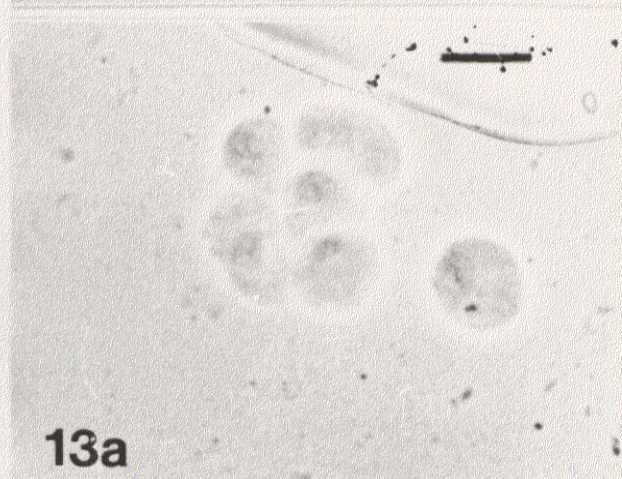
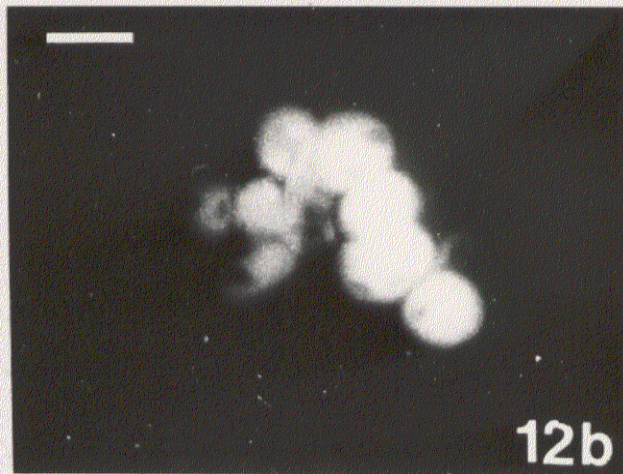
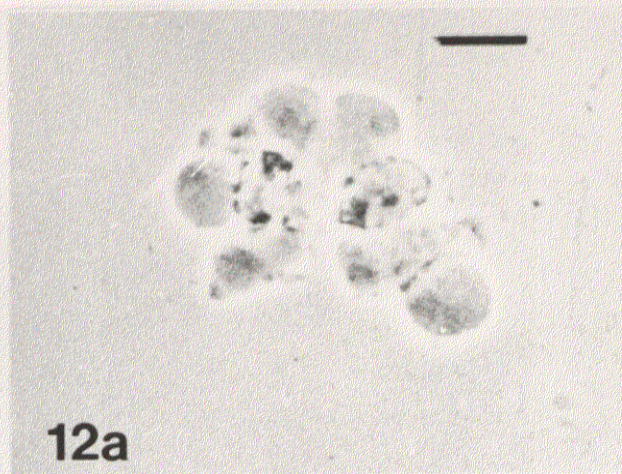
MATRIZ NUCLEAR OBTENIDA REALIZANDO LAS DIGESTIONES ENZIMATICAS ANTES DE LA EXTRACCION SALINA (PROC II). Control de la eliminación del ADN por fluorescencia. a: contraste de fase. b: fluorescencia a 365 nm.

FIG 12a. Núcleos aislados visualizados en contraste de fase. 12b. Los mismos núcleos observados a 365 nm. Aparecen como esferas brillantes de color violeta excepto las áreas de los nucleolos. x1.100 La barra representa 10 μ m

FIG 13a. Núcleos aislados extraídos con Tritón X-100 al 0.5%, y visualizados en contraste de fase. 13b. Los mismos núcleos observados a 365 nm. Aparecen como esferas brillantes de color violeta excepto las áreas de los nucleolos. x1.100. La barra representa 10 μ m

FIG 14a. Núcleos aislados extraídos con Tritón X-100 al 0.5%, y digeridos con 250 μ gr/ml DNasa I y 250 μ gr/ml RNasa A, visualizados en contraste de fase. 14b. Los mismos núcleos observados a 365 nm. La fluorescencia disminuye drásticamente con relación a la extracción anterior, siguen observandose oscuras las áreas de los nucleolos. x1.100. La barra representa 10 μ m

FIG 15a. Matrices nucleares finales visualizadas en contraste de fase. 15b. Las mismas matrices observadas a 365 nm Se comprueba la práctica desaparición de la fluorescencia, la mancha fluorescente de la fig.15b corresponde a un trozo de pared celular que presenta autofluorescencia. x1.100. La barra representa 10 μ m



3.2 MORFOLOGIA Y ULTRAESTRUCTURA

EXTRACCION CON TRITON X-100

Después de la extracción con Tritón X-100 la envuelta nuclear pierde su componente lipídico y aparece como una capa continua, densa a los electrones, en conexión con las estructuras de las regiones intercromatínicas, y en ella se reconocen los poros complejos (Fig 17).

Las masas de cromatina condensada tienen una densidad electrónica menor, y una apariencia más laxa que en los núcleos aislados, siendo claramente observable al M.E. su organización fibrilar formada por fibras de apariencia nucleosómica con un grosor aproximado 4 nm. (Fig. 19). A grandes aumentos se observa cómo estas fibras conectan con la capa subyacente de la envuelta nuclear y las masas de las regiones intercromatínicas (Figs.17 y 19).

Las regiones intercromatínicas forman un retículo de densidad electrónica media en el interior del núcleo y se encuentran confinadas por la cromatina laxa. Están formadas por una red fibrilar de 5 nm a la que se encuentran asociadas al igual que en el núcleo aislado, dos tipos de gránulos más densos: unos con un diámetro de 40-45 nm y otros de diámetro menor (25-30nm) (Fig. 19).

El nucleolo conserva una organización similar a la que presenta en el núcleo aislado aunque mucho más laxa, distinguiéndose con dificultad la separación entre sus componentes a excepción de los centros fibrilares, que presentan una densidad

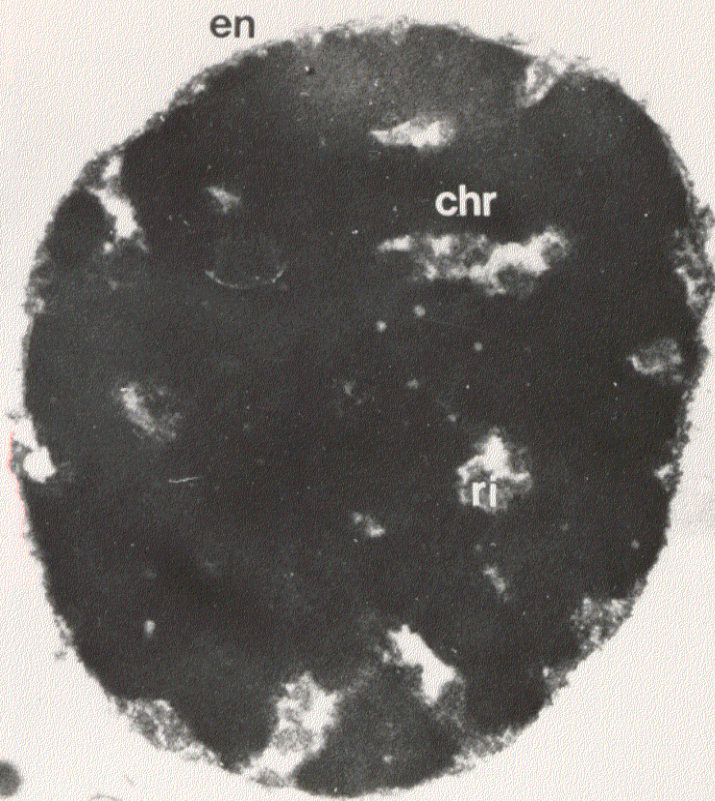
EXTRACCION CON TRITON X-100

FIG 16. Núcleo control fijado convencionalmente en glutaraldehído-osmio y contrastado con acetato de uranilo-citrato de plomo. La envuelta nuclear (en) forma una doble capa continua, las masas de cromatina condensada (chr) aparecen densamente teñidas y las regiones intercromatínicas (ri) como zonas de menor contraste electrónico. x21.044 La barra representa 1 μ m

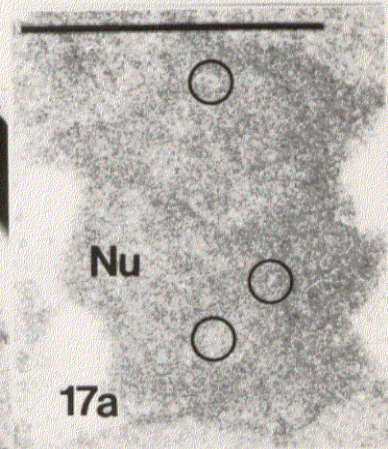
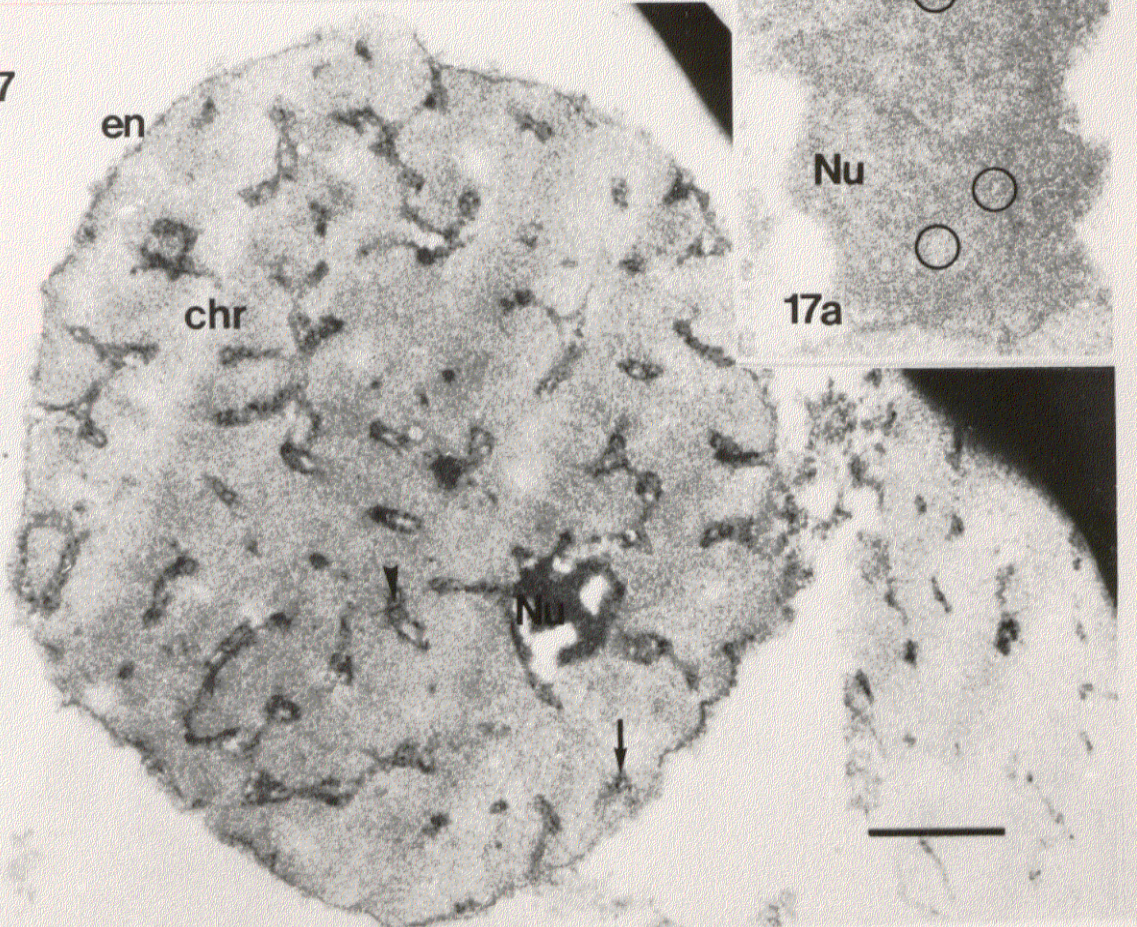
FIG 17. Núcleo aislado extraído con Tritón X-100 al 0.5%, fijado en glutaraldehído-osmio y contrastado con acetato de uranilo-citrato de plomo. La envuelta nuclear (en) desprovista de elementos membranosos, forma una capa continua. Las masas de cromatina condensada (chr) presentan una densidad electrónica menor y una apariencia más laxa que en los controles. En las regiones intercromatínicas se distinguen gránulos de 40 nm (punta de flecha) y de 25 nm (flecha). x17.100. La barra representa 1 μ m

FIG 17a. Detalle a mayor aumento del nucleolo de núcleos aislados y extraídos con Tritón X-100 al 0.5 %. Presenta una apariencia más laxa que la de los nucleolos de núcleos control. Las estructuras que mejor se disciernen son los centros fibrilares (círculos) que aparecen como zonas de baja densidad electrónica. x38.988 La barra representa 1 μ m

16



17

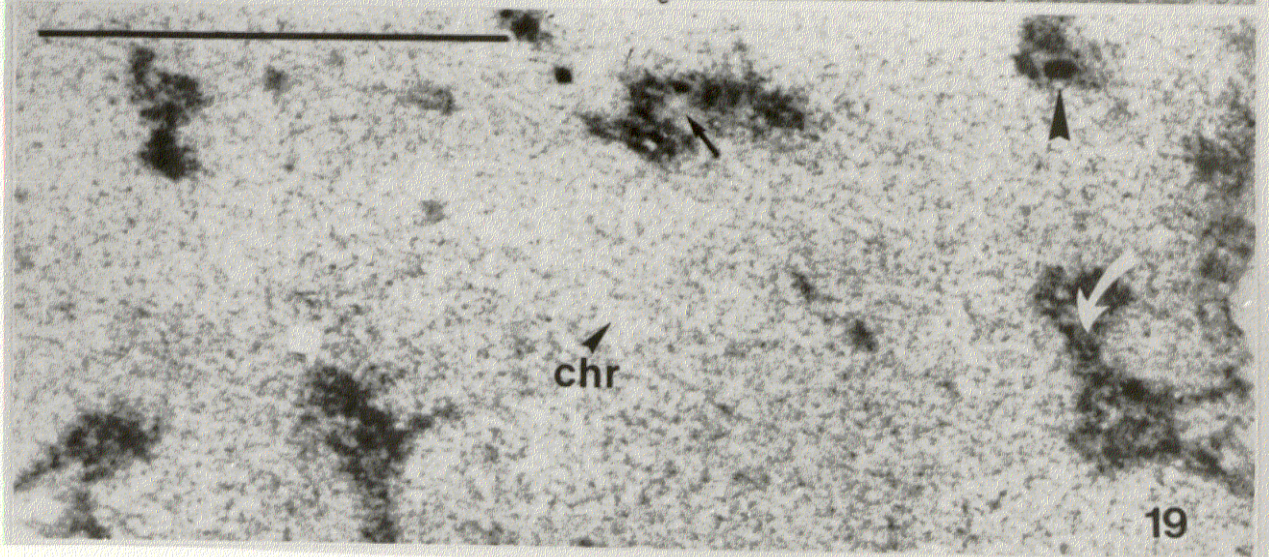
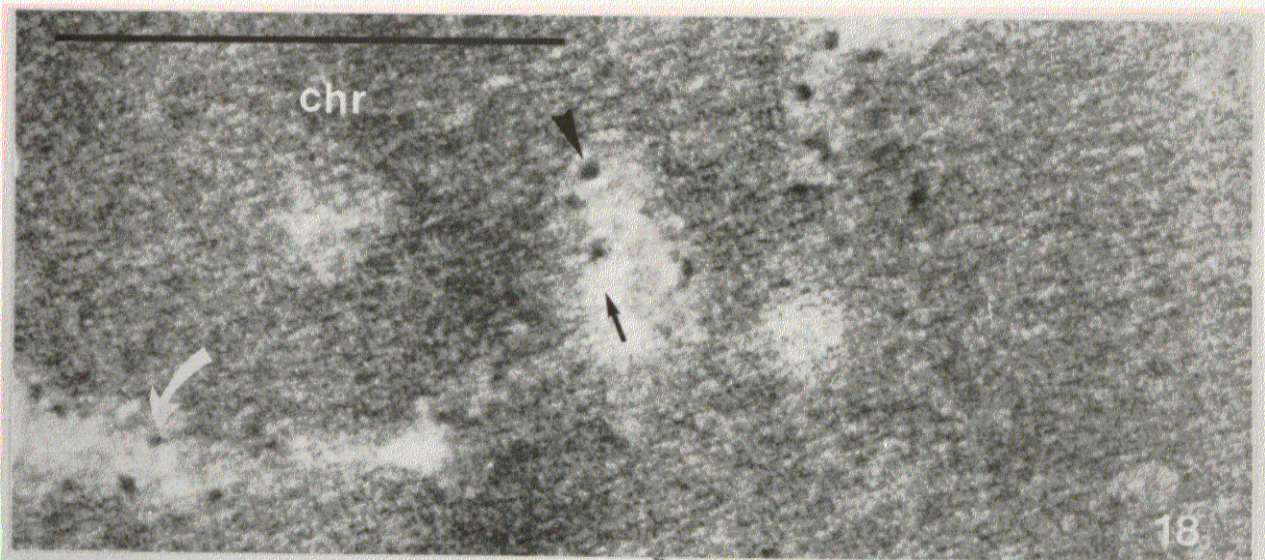


EXTRACCION CON TRITON X-100

FIG.18 Detalle a gran aumento de las regiones intercromatínicas de núcleos aislados, fijados en glutaraldehído-osmio y contrastados con acetato de uranilo-citrato de plomo. Las regiones intercromatínicas aparecen como zonas claras bordeadas por las masas de cromatina condensada (chr). En el interior de estas regiones se distinguen gránulos de 40 nm (punta de flecha negra), de 25-30 nm (flecha blanca) y fibras de 5nm (flecha negra). x67.000. La barra representa 1 μ m

FIG.19 Detalle a gran aumento de las regiones intercromatínicas de núcleos aislados, tratados con Tritón X-100 al 0.5%, fijados en glutaraldehído-osmio y contrastados con acetato de uranilo-citrato de plomo. Las regiones intercromatínicas aparecen como zonas de mayor contraste electrónico en relación a las masas de cromatina circundantes que aparecen muy relajadas y con densidad electronica muy baja (chr). En el interior de las regiones intercromatínicas se distinguen gránulos de 40 nm (punta de flecha grande), de 25-30 nm (flecha negra) y fibras de 5 nm (flecha blanca). Las masas de cromatina (chr) estan formadas por fibras de 4 nm (punta de flecha pequeña). x61.500. La barra representa 1 μ m





electrónica menor (Fig 17a).

DIGESTION CON NUCLEASAS

El efecto más patente de la digestión exhaustiva con DNasa I y RNasa A sobre la morfología del núcleo es la desaparición de las grandes masas de cromatina, de forma que las amplias áreas que ocupaban aparecen ahora transparentes a los electrones. A veces se observan algunos restos de cromatina en estas áreas que se visualizan como masas poco estructuradas, densas a los electrones, adosadas a las regiones intercromatínicas, o subyacentes a la envuelta periférica (Fig. 20).

En este estadio de extracción los núcleos residuales están constituidos por tres componentes estructurales: la envuelta residual en la que se distinguen los poros complejos; el nucleolo residual y las regiones intercromatínicas que conectan la envuelta con el nucleolo (Fig 20).

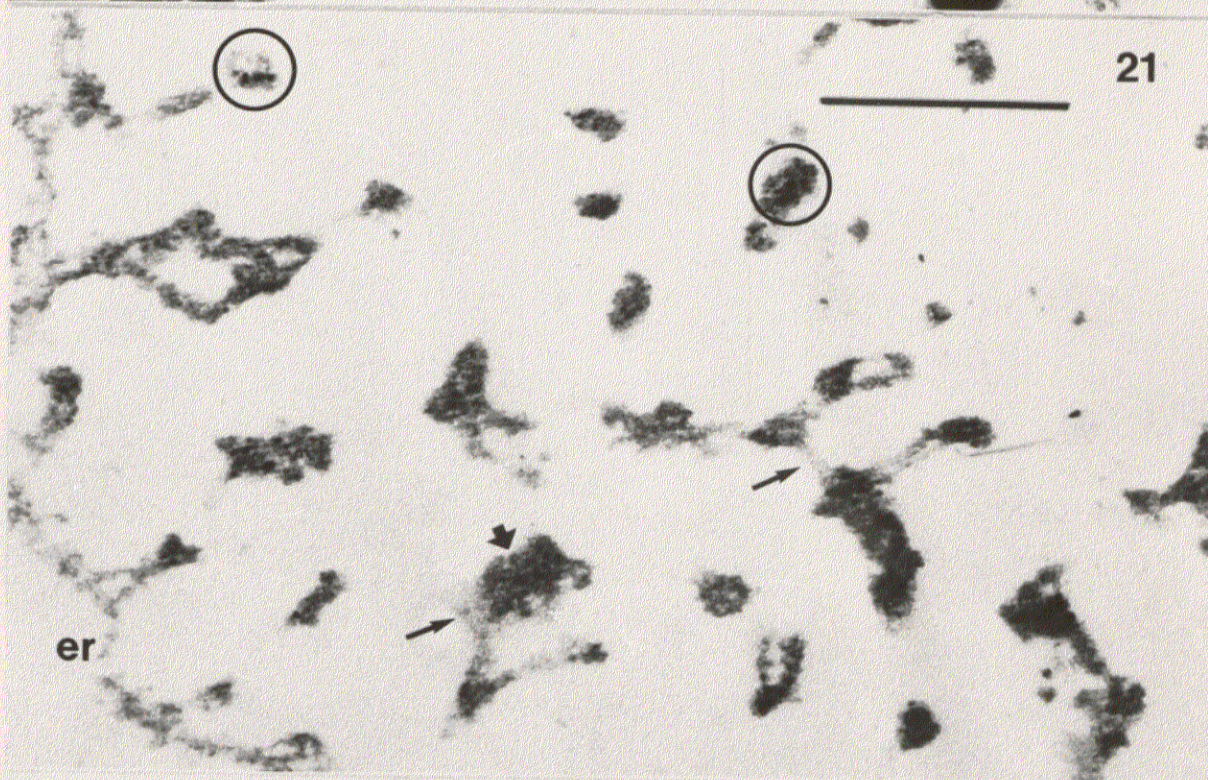
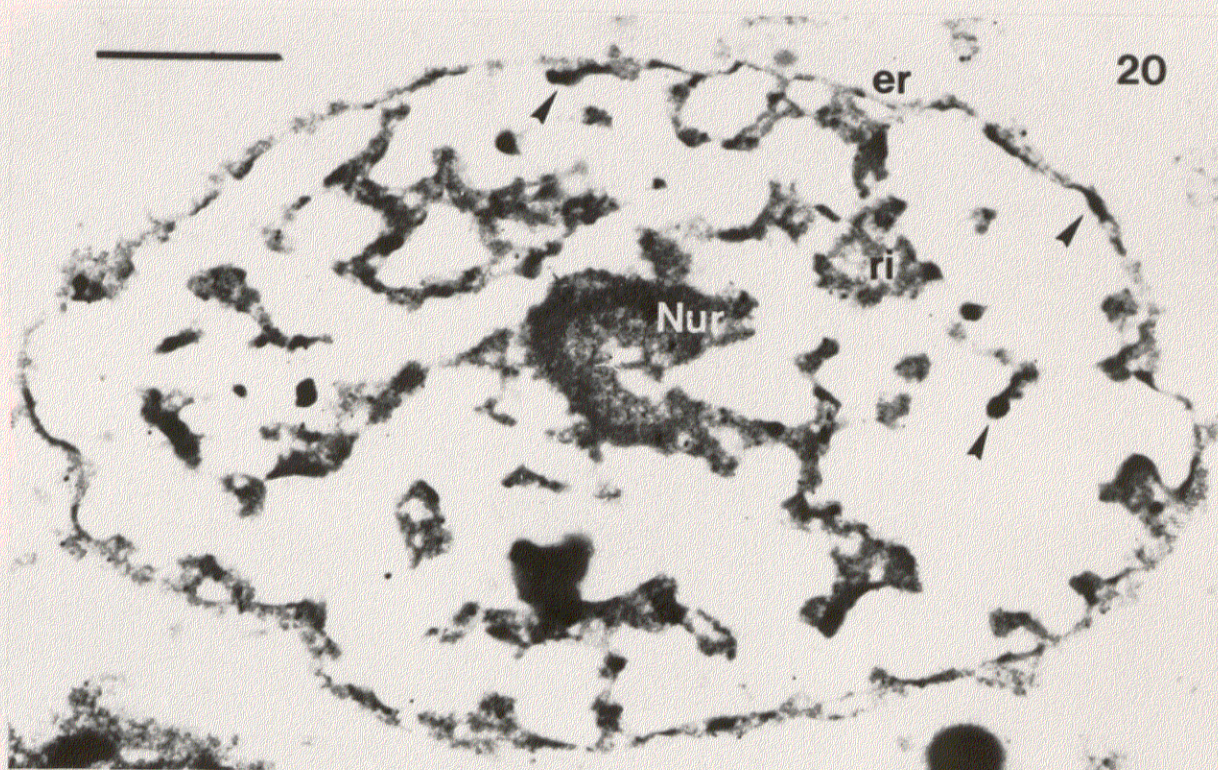
La envuelta residual no aparece muy afectada por las digestiones, presentando la misma morfología que en la extracción con Tritón X-100. Sin embargo, la eliminación de la mayor parte de la cromatina condensada adosada a ellas permite una mejor visualización de su estructura. La envuelta residual forma una capa continua con una organización fibrilar constituida por fibras de 10 nm de diámetro, a la que se encuentran asociados los poros nucleares (Fig 20).

Después de las digestiones, la región intercromatínica revela una estructura fibrilogramular compleja. Se distingue en ella un entramado de fibras homogéneas de aproximadamente 5 nm de diámetro y densidad electrónica media que presenta

DIGESTION CON NUCLEASAS

FIG.20 Núcleo residual extraído con Tritón X-100 al 0.5 % y digerido con 250 μ gr/ml DNasa I y 250 μ gr/ml RNasa A fijado en glutaraldehído-osmio y contrastado con acetato de uranilo-citrato de plomo. Está constituido por tres componentes estructurales: envuelta residual (er), nucleolo residual (Nur), y regiones intercromatínicas (ri). El nucleolo residual (Nur) presenta una estructura fundamentalmente fibrilar. A veces se observan restos de cromatina condensada, adosadas a las regiones intercromatínicas o subyacentes a la envuelta periférica (puntas de flecha). x23.940. La barra representa 1 μ m

FIG.21 Detalle a mayor aumento de las regiones intercromatínicas y de la envuelta residual. La envuelta residual (er) presenta estructura fibrilar formada por fibras de 10 nm. En las regiones intercromatínicas se distinguen dos entramados fibrilares de diferente densidad electrónica. El de menor densidad electrónica (flechas negras largas) está constituido por fibras de 5 nm y el más denso a los electrones por fibras de aproximadamente 10 nm (flecha negra gruesa). Las regiones intercromatínicas presentan asociados gránulos de 25-30 nm (círculos). x31.840. La barra representa 1 μ m



asociados gránulos más densos de tamaño variable (24-40 nm) (Fig.21), y otro entramado fibrilar diferente del anterior, más denso a los electrones y que está formado por fibras de 10 nm de diámetro (Fig. 21).

Después de las digestiones enzimáticas, el nucleolo sufre una fuerte extracción desapareciendo como tal el componente granular. Su estructura es ahora fundamentalmente fibrilar, con fibras de aproximadamente 10 nm de diámetro, aunque a veces presenta algunos gránulos asociados de tamaño variable (20-40 nm) (Fig. 20).

EXTRACCION CON BAJA CONCENTRACION DE MAGNESIO

El efecto más notorio sobre la morfología nuclear, después de la extracción en tampones con baja concentración de magnesio es la desaparición total de los restos de cromatina condensada que aparecían asociados al resto de los componentes nucleares (Fig. 23).

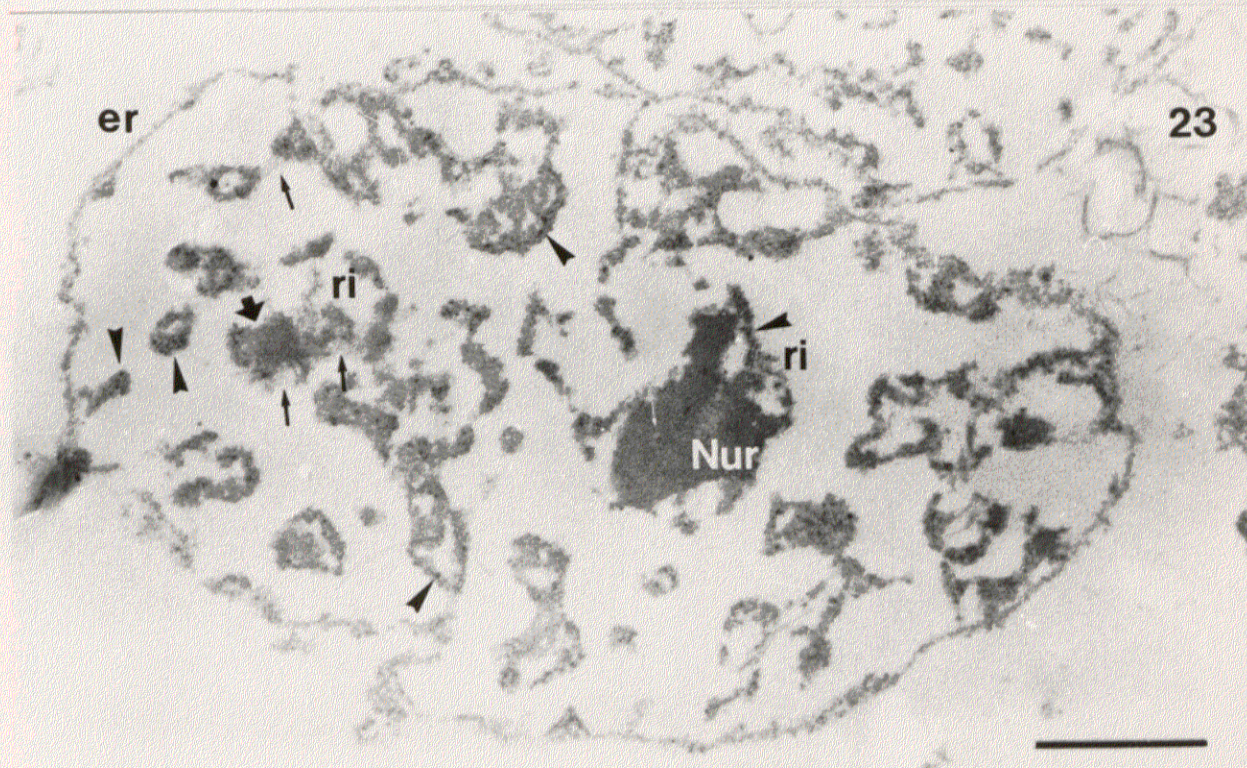
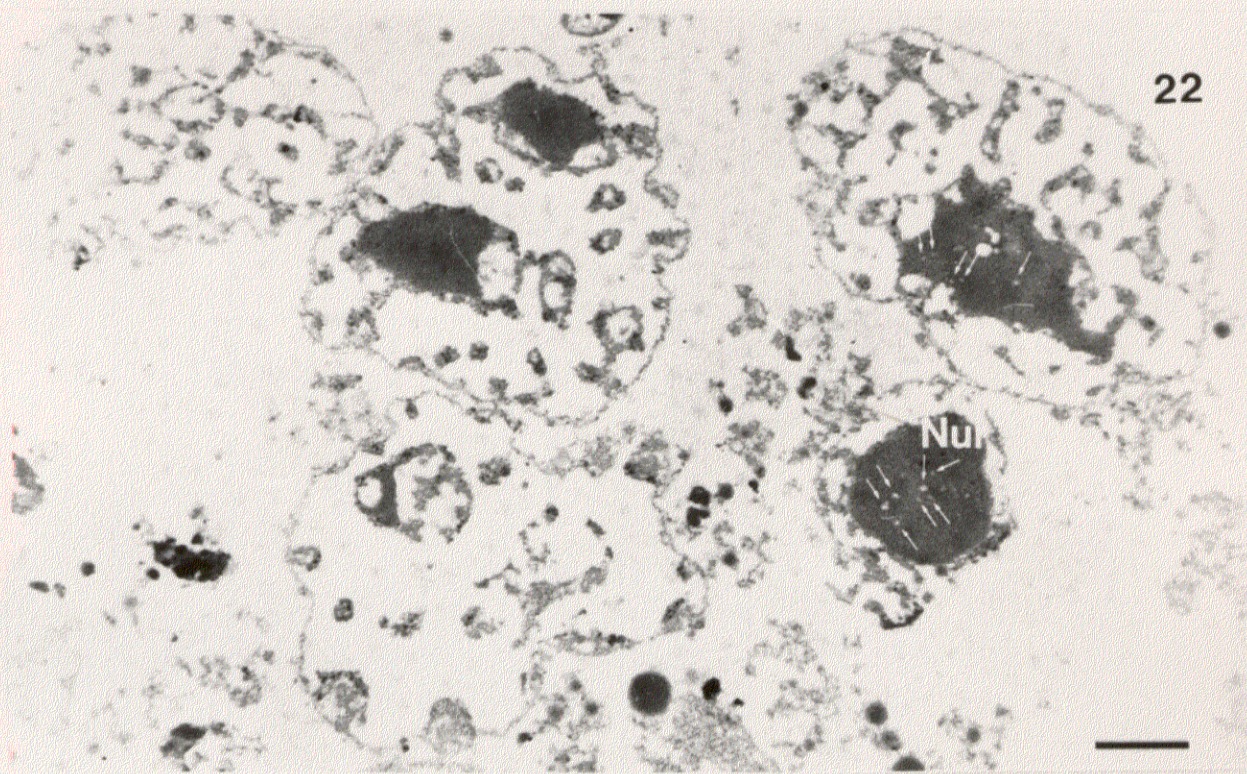
La envuelta residual aparece libre de masas de cromatina, haciéndose muy evidente su estructura que no aparece afectada respecto a las extracciones anteriores. En secciones transversales, muestra una organización fibrilar compleja en la que se distinguen fibras de 10 nm de diámetro y poros nucleares (Fig. 23). Se observan claramente sus conexiones con las estructuras residuales de las regiones intercromatínicas.

En las regiones intercromatínicas persiste la malla fibrilar fina (fibras de 5 nm) revelada por las digestiones enzimáticas. Esta malla puede observarse bien formando un retículo homogéneo sin ningún tipo de estructuras asociadas, presentar asociados

EXTRACCION CON BAJA CONCENTRACION DE MAGNESIO

FIG.22 Fracción de núcleos residuales extraídos con Tritón X- 100 al 0.5% , digeridos con 250 μ gr/ml DNasa I y 250 μ gr/ml RNasa A, y extraídos con 0.2 mM acetato magnésico, fijados en glutaraldehído-osmio y contrastados con acetato de uranilo-citrato de plomo. Los núcleos residuales muestran una extracción homogénea, observándose algunos restos entre ellos procedentes de su rotura, principalmente de elementos de las regiones intercromatínicas residuales. Los nucleolos (Nur) aparecen poco extraídos con una estructura compacta excepto en las áreas de los centros fibrilares (flechas blancas). La cromatina condensada aparece prácticamente digerida. x12.015. La barra representa 1 μ m

FIG.23 Núcleo residual a mayor aumento. Se observa la desaparición de los remanentes de cromatina condensada. La envuelta residual (er) muestra una organización fibrilar, está formada por fibras de 10 nm. Las regiones intercromatínicas (ri) presentan una organización similar a la de los núcleos residuales de la fracción anterior. Se observan dos entramados fibrilares de diferente densidad electrónica (flechas negras delgada y gruesa) y gránulos asociados de 25-30 nm (puntas de flecha). El nucleolo residual (Nur) muestra una organización fibrilar compacta, distinguiéndose los centros fibrilares (flecha blanca). x21.888. La barra representa 1 μ m



gránulos de 25-30 nm, o bien en conexión con la otra malla fibrilar más densa a los electrones, compuesta de fibras de 10 nm. Esta malla presenta con frecuencia una organización en zig-zag (Fig 23).

El nucleolo residual muestra una estructura fibrilar compacta con fibras de aproximadamente 10 nm. En su interior se observan claramente estructuras análogas a los centros fibrilares (Fig.22) en cuyo interior, a su vez, se aprecian fibrillas de 5 nm de diámetro. Adosadas a la periferia nucleolar aparecen masas de las regiones intercromatínicas con estructura fibrilo-granular (Fig. 23).

EXTRACCION CON ALTA FUERZA IONICA (2M ClNa)

Las estructuras residuales obtenidas, después de esta última extracción en tampón de alta fuerza iónica, constituyen las matrices nucleares propiamente dichas, que no presentan cambios notables en su morfología de conjunto con respecto a los núcleos de la extracción anterior, excepto en el nucleolo que aparece mucho más extraído. Constan de tres componentes morfológicos claramente delimitados: lámina, nucleolo residual y matriz interna (Fig. 24).

La lámina forma una envuelta continua alrededor de la matriz nuclear, con una organización fibrilar compleja formada por fibras de 10 nm de diámetro. En ella se encuentran integrados los poros nucleares que conservan su estructura hexagonal típica, observable en secciones favorables (Fig. 26). La lámina presenta continuidad con las fibras de la matriz interna (Figs. 25, 26, 28).

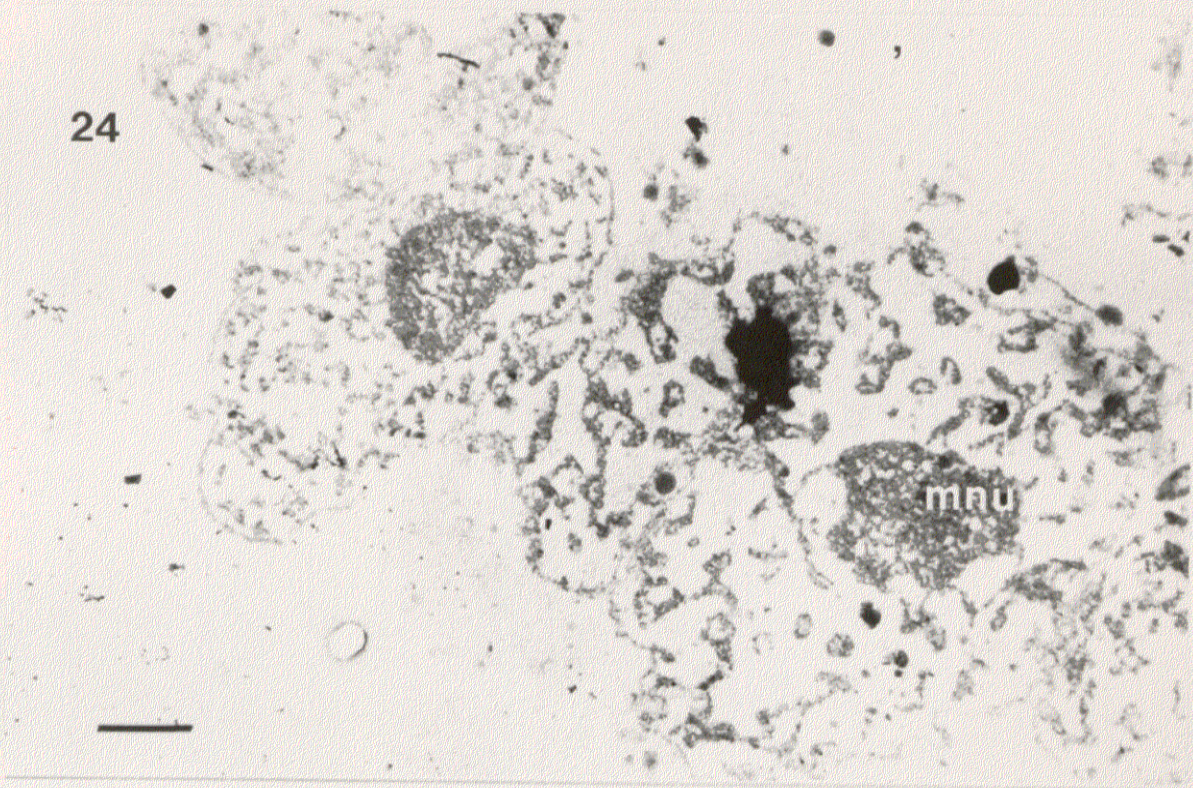
La matriz interna forma un retículo en el interior de la matriz nuclear que conecta

MATRIZ NUCLEAR (PROC II). NUCLEOS EXTRAIDOS EN TRITON X-100 al 0.5 %,DIGERIDOS CON 250 μ gr/ml DNasa I y 250 μ gr/ml RNasa A Y EXTRAIDOS EN 0.2 mM ACETATO MAGNESICO Y 2M ClNa

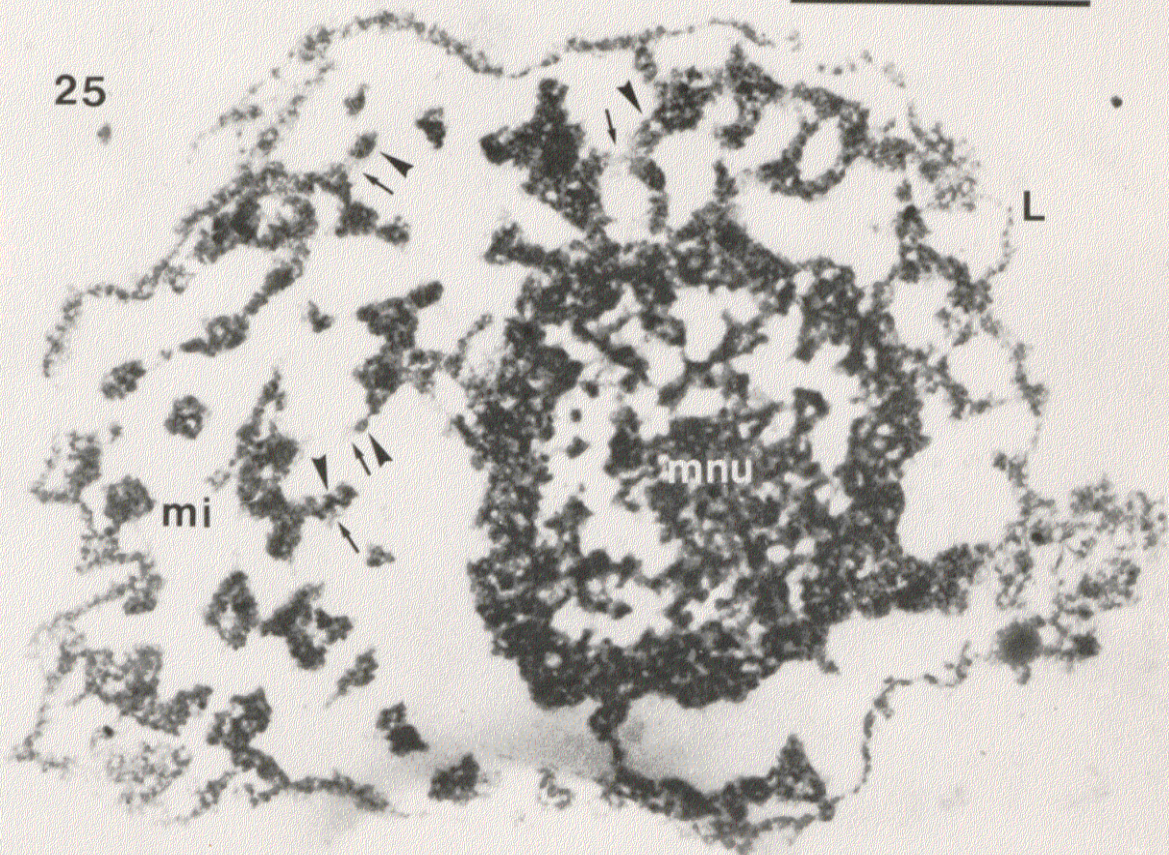
FIG.24 Fracción de matrices nucleares, fijadas en glutaraldehído-osmio y contrastadas con acetato de uranilo-citrato de plomo. La fracción no muestra contaminación ni restos de rotura de matrices. Las matrices aparecen más extraídas que en la extracción anterior, principalmente las matrices nucleolares (mnu). x11.970. La barra representa 1 μ m

FIG.25 Matriz nuclear. Constituida por la lámina (L), la matriz interna (mi) y la matriz nucleolar (mnu). En la matriz interna se observan los dos entramados fibrilares de diferente densidad a los electrones (flechas y puntas de flecha negra). La matriz nucleolar aparece muy extraída. x38.475. La barra representa 1 μ m

24



25

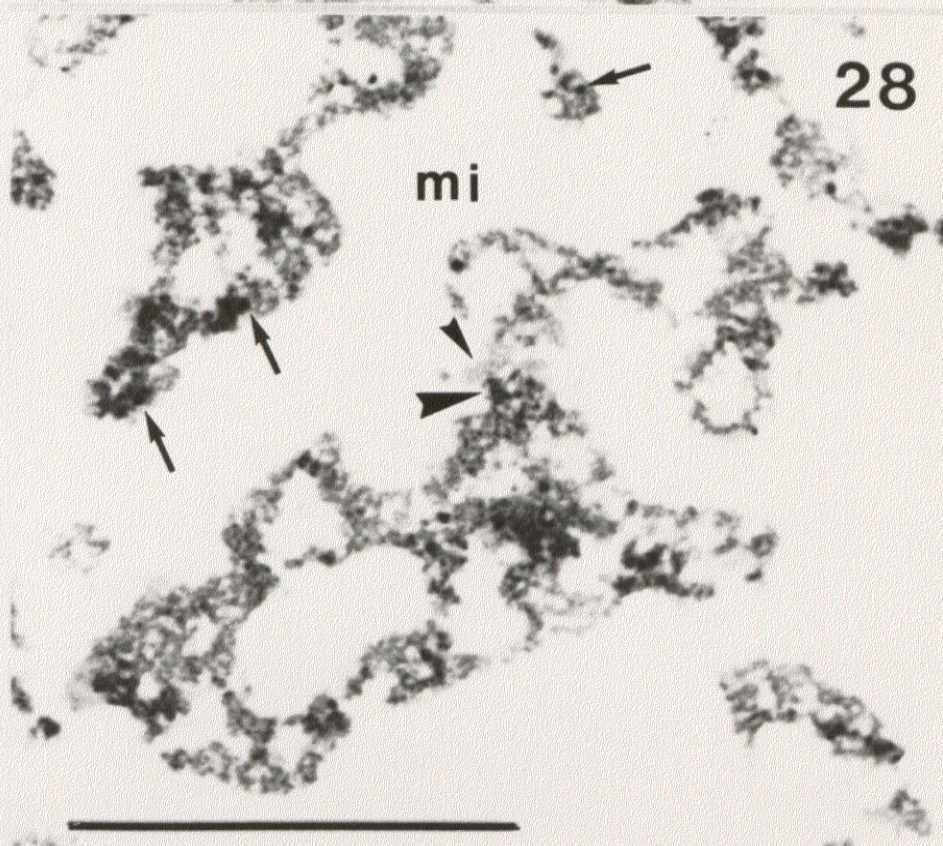
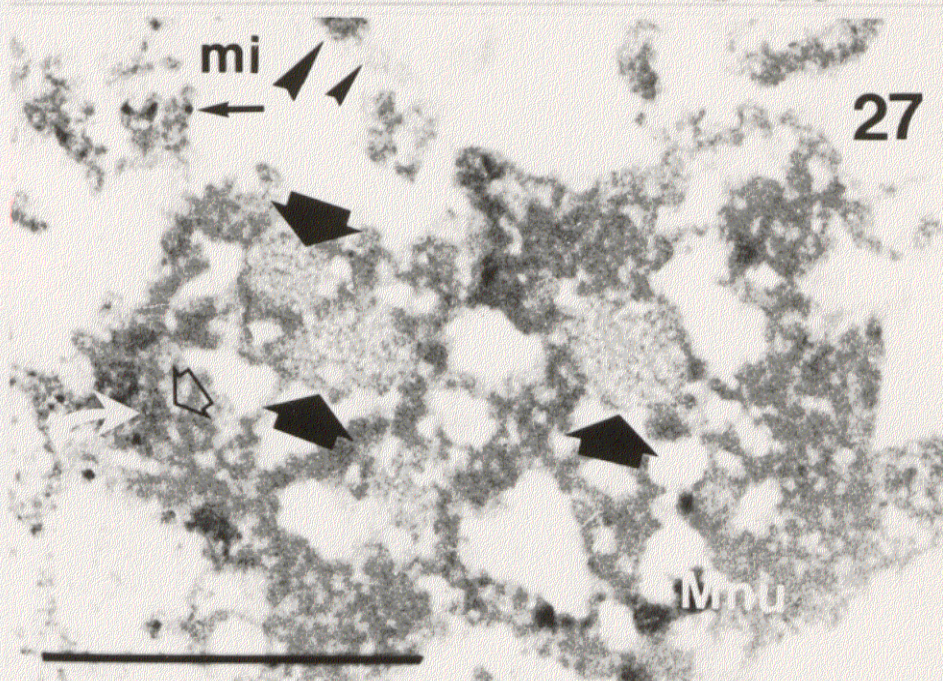
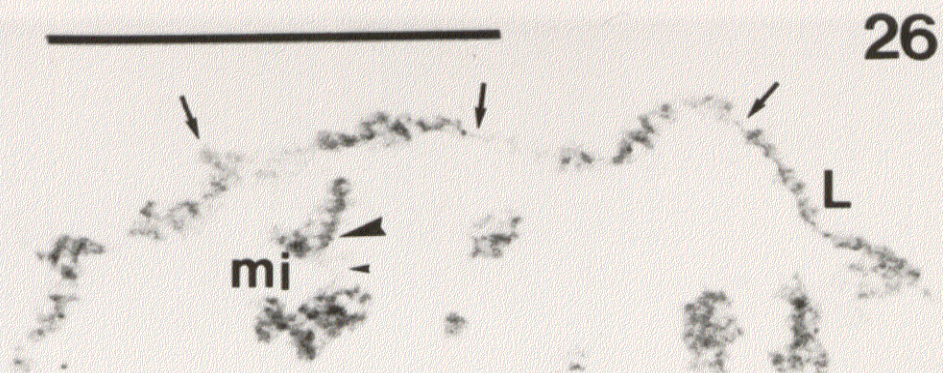


MATRIZ NUCLEAR (PROC II).NUCLEOS EXTRAIDOS EN TRITON X-100 AL 0.5%, DIGERIDOS CON 250 μ gr/ml DNasa I, y 250 μ gr/ml RNasa A Y EXTRAIDOS EN 0.2mM ACETATO MAGNESICO Y 2M ClNa

FIG.26 Lámina (L) ..Presenta una organización fibrilar constituida por fibras de 10 nm. En ella se encuentran integrados los poros complejos residuales (flechas negras). En las regiones de matriz interna (mi) unidas a la lámina se observan dos mallas fibrilares de diferente densidad electrónica (puntas de flecha grande y pequeña). x58.000. La barra representa 1 μ m

FIG.27 Matriz nucleolar (mnu). Muestra una estructura exclusivamente fibrilar formada por fibras de 5nm que se estructuran en reticulos fibrilares más amplios (flecha blanca). En el interior de estos retículos se observan fibras de menor contraste (flecha vacía). Las flechas negras grandes señalan centros fibrilares residuales. La matriz interna (mi) adyacente presenta dos mallas de diferente densidad electrónica (puntas de flecha grande y pequeña) y gránulos asociados de 25-30 nm (flecha delgada negra). x50.000. La barra representa 1 μ m.

FIG.28 Matriz interna (mi). Presentados mallas de diferente densidad electrónica (puntas de flecha) y numerosos gránulos asociados de 25-30 nm , algunos de los cuales se señalan con flechas negras. x58.000. La barra representa 1 μ m .



la lámina con el nucleolo residual. Tiene una organización fibrillogranular y se correlaciona topológicamente con las regiones intercromatínicas de las fracciones anteriores. La extracción en alta fuerza iónica no parece afectar a su organización, puesto que se distinguen en ella los dos tipos de mallas descritos en la fracción anterior, es decir, la malla fibrilar homogénea formada por fibrillas de 5 nm, la malla densa a los electrones y configuración en zig-zag y los gránulos de 25-30 nm. Aunque la malla densa a los electrones está formada por fibras gruesas de aproximadamente 15 nm de grosor (Fig. 28).

La matriz nucleolar presenta una estructura mucho más laxa y exclusivamente fibrilar. Está formada por fibrillas de 5 nm que se estructuran en retículos más amplios (12-24 nm) formando un entramado que se extiende por todo el nucleolo y contacta con las fibras de la matriz interna adyacentes (Fig. 27). La extracción en alta fuerza iónica no afecta la morfología de sus centros fibrilares que aparecen tan evidentes como en la fracción anterior (Figs. 23 y 27).

Cuando se obtienen matrices nucleares siguiendo el orden de extracción anteriormente expuesto, pero omitiendo los cationes divalentes tanto en el tampón de aislamiento de núcleos como en los tampones de extracción, no se consiguen matrices nucleares intactas. En su lugar, se obtienen estructuras rotas y desorganizadas, y agregados residuales de difícil identificación formados por una extensa malla de fibras de 5-7 nm con gránulos asociados de tamaño variable (25-40 nm) (Figs 29, 30 y 31). Los cationes divalentes parecen imprescindibles para mantener una morfología estructurada en la matriz nuclear.

Si se obtienen matrices nucleares a partir de núcleos aislados en ausencia de

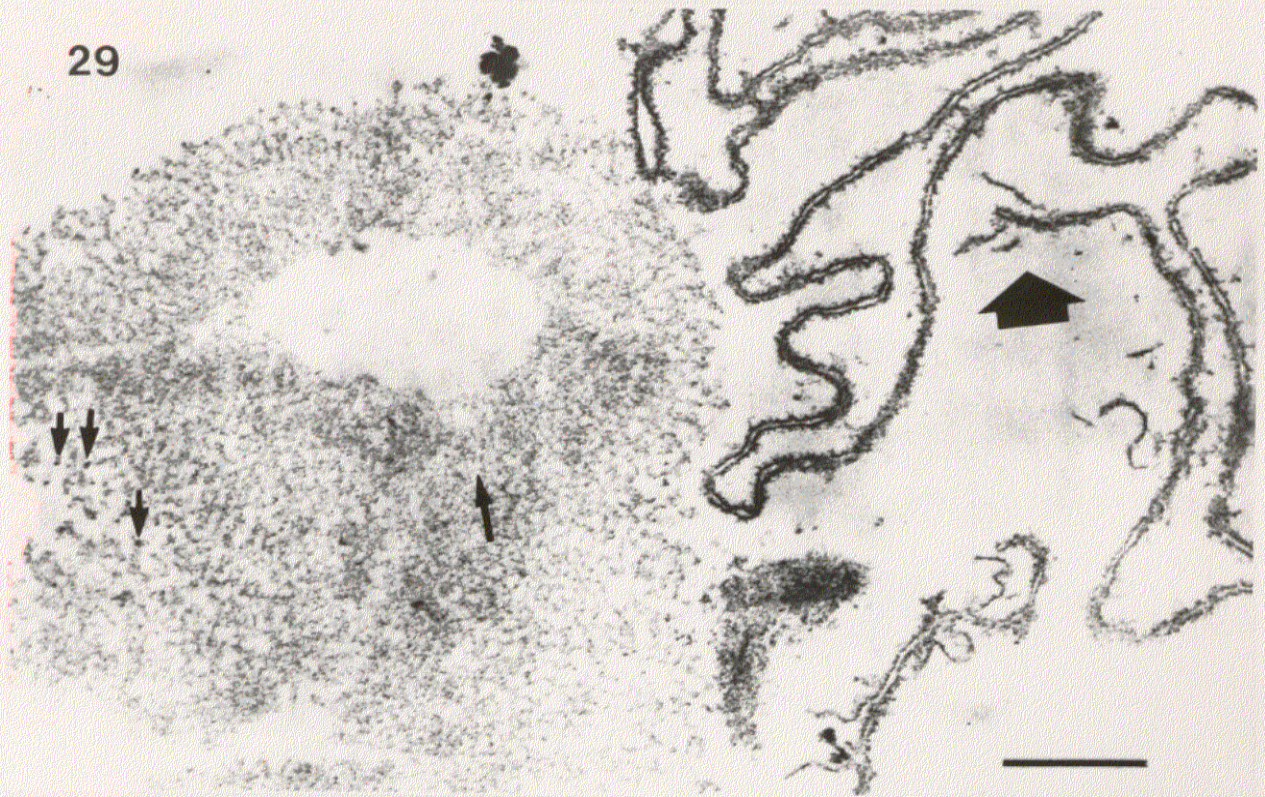
EFFECTO DE LA OMISION DE LOS CATIONES DIVALENTES EN TODOS LOS TAMPONES DE EXTRACCION

FIG.29 Aspecto de las fracciones obtenidas cuando se omiten los cationes divalentes en todos los tampones de extracción siguiendo el procedimiento extractivo II, en las que no se observan matrices nucleares intactas. En ellas se observan estructuras fibrilares, con fibras arrosariadas (flecha) que presentan gránulos de tamaño variable (25-40nm) (flechas pequeñas), y otras que presentan ordenaciones paralelas (flecha grande). x19.000. La barra representa 1 μ m

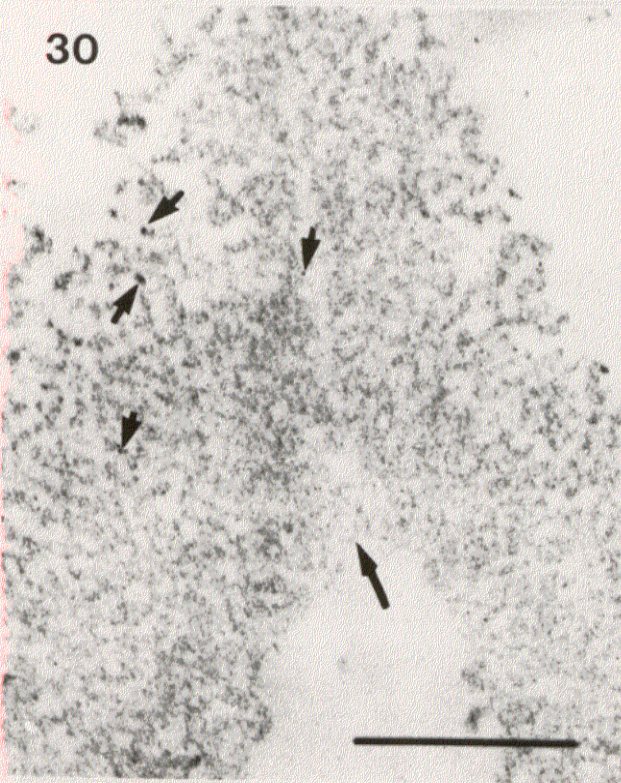
FIG.30 Detalle a mayor aumento de la FIG 29. Las flechas negras pequeñas señalan gránulos de tamaño variable. La flecha negra grande señala las fibras de la malla fibrilar. x29.000. La barra representa 1 μ m

FIG.31 Detalle a mayor aumento de la matriz mostrada en la FIG 29. Las flechas negras pequeñas señalan gránulos de tamaño variable. Las flechas grandes señalan parte de la malla fibrilar en corte tangencial y en corte transversal. x29.000. La barra representa 1 μ m

29



30



31

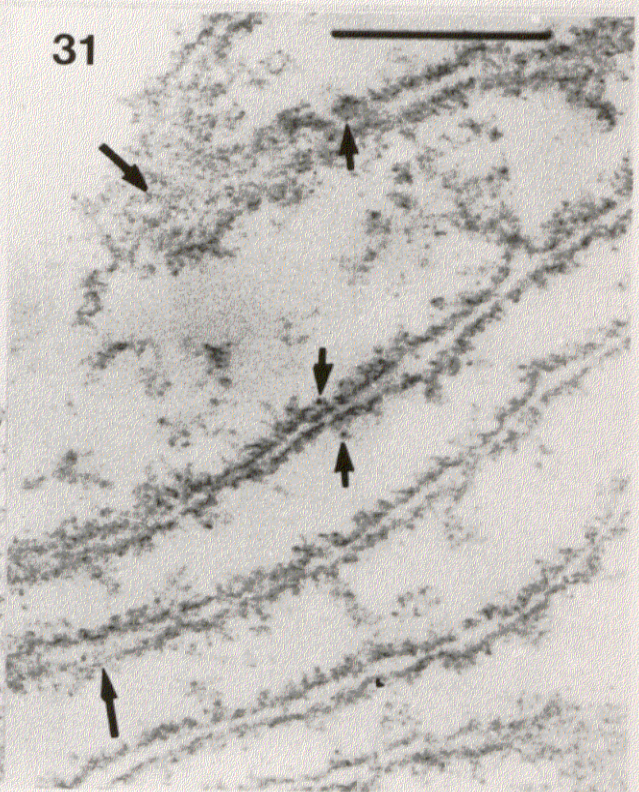
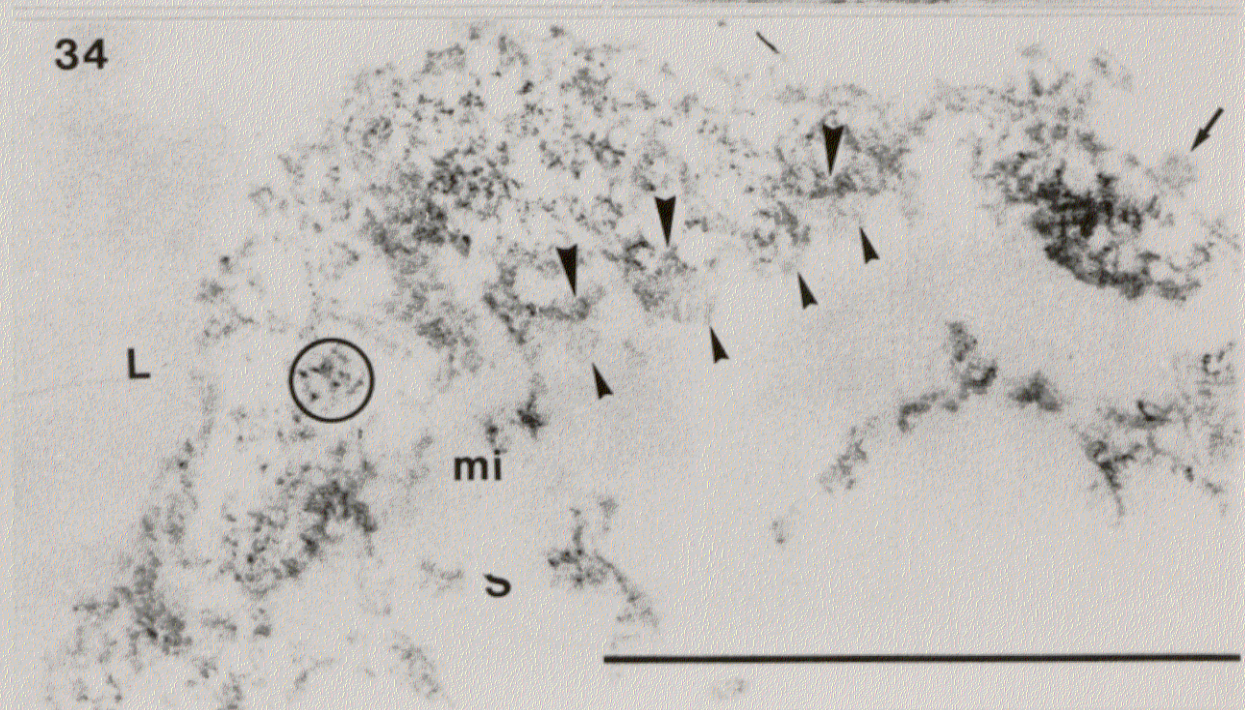
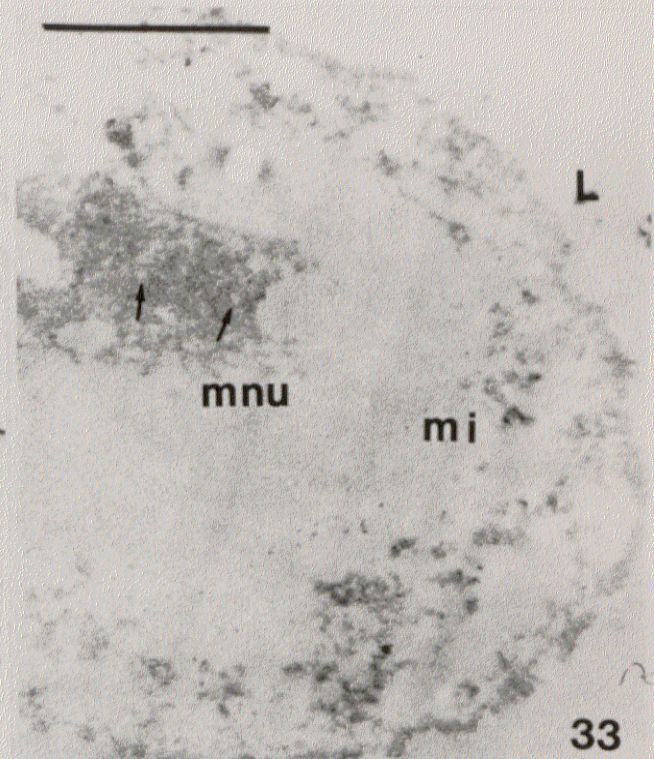


FIG.32 Núcleo control aislado en ausencia de acetato magnésico y dietil-pirocarbonato, fijado en glutaraldehído-osmio y contrastado con acetato de uranilo-citrato de plomo. La ausencia de acetato magnésico y DPC produce la eliminación de gran parte de las masas de cromatina condensada (chr). Envuelta nuclear (en). Regiones intercromatínicas (ri). Nucleolo residual (nur). x13.500. La barra representa 1 μ m

FIG.33 Matriz nuclear obtenida a partir de núcleos aislados en ausencia de acetato magnésico y dietil-pirocarbonato. Muestra una estructura más laxa que las anteriores, está formada por fibras muy finas (≈ 4 nm). Se distinguen los tres componentes típicos: Lámina (L), matriz interna (mi) y matriz nucleolar (mnu). Esta última es exclusivamente fibrilar y en ella aparecen zonas claras correspondientes a los centros fibrilares residuales (flechas). x29.000. La barra representa 1 μ m

FIG.34 Detalle a mayor aumento de la lámina y la matriz interna. La lámina (L) presenta una organización fibrilar en la que se encuentran integrados los poros complejos residuales (flecha). En la matriz interna se distinguen dos zonas con distinta organización. Una es exclusivamente fibrilar (puntas de flecha) y otra fibrilogramular con numerosos gránulos de 15-18nm (círculos). x83.000. La barra representa 1 μ m



dietilpirocarbonato (inhibidor de RNasas) y acetato de Magnesio (Fig. 32), la matriz nuclear resultante presenta una morfología mucho más laxa que la obtenida en condiciones "standard", aunque está constituida por los tres componentes típicos: lámina, matriz interna y matriz nucleolar. Estas estructuras mantienen la misma distribución topológica y conexiones entre sí que en la matriz obtenida a partir de núcleos aislados en presencia de dietilpirocarbonato y acetato de Magnesio. Los tres componentes presentan una estructura fina muy similar. Están formados por fibras muy finas (≈ 4 nm de diámetro) y sólo la matriz interna presenta gránulos asociados de pequeño tamaño (15-18 nm). Esta última estructura es la más afectada por la ausencia de inhibición de RNasas, sus elementos son muy poco abundantes, se siguen observando dos mallas de diferente contraste a los electrones pero no los gránulos de 25-30 nm, que son estructuras típicas de la matriz interna final (Figs. 33 y 34). La lámina no se afecta a nivel morfológico por la ausencia de dietilpirocarbonato y acetato de Magnesio en la preparación de los núcleos.

3.3 COMPOSICION POLIPEPTIDICA

Se ha analizado la composición polipeptídica de la matriz nuclear obtenida por este procedimiento así como de los núcleos residuales de cada extracción, efectuando electroforesis monodimensionales para cada una de las fracciones nucleares (Fig. 35).

La extracción con Tritón-X 100 no modifica significativamente el perfil de estos núcleos con respecto al de los núcleos aislados (Fig. 35, carreras 1 y 2). Los núcleos digeridos con DNasa 1 y RNasa A y extraídos en tampón de baja fuerza iónica (0.2 mM Cl_2Mg) presentan un perfil de bandas muy heterogéneo. Entre ellas pueden observarse las bandas proteicas en el rango 63-50 KD y a 37 KD (Fig. 35, carrera 3). Son

FIG.35 COMPOSICION POLIPEPTIDICA DE LA MATRIZ NUCLEAR Y DE LAS FRACCIONES NUCLEARES RESIDUALES OBTENIDAS REALIZANDO LAS DIGESTIONES CON NUCLEASAS ANTES DE LA EXTRACCION SALINA (PROC II), en geles SDS-PAGE al 10 %, teñidos con azul de Coomassie. 1. Núcleos. 2. Fracción nuclear residual obtenida por extracción con Tritón X-100 al 0.5%. La extracción con el detergente no modifica significativamente el perfil polipeptídico. 3. Fracción nuclear residual obtenida por extracción en Tritón X-100 al 0.5 % , digestiones enzimáticas con 250 μ gr/ml DNasa I y 250 μ gr/ml RNasa A y extracción posterior en 0.2mM acetato magnésico. Presenta numerosas bandas entre las que se detectan claramente las de la matriz nuclear. 4. Matriz nuclear. La extracción final con 2M ClNa elimina la mayoría de las proteínas presentes en la fracción anterior, excepto las bandas matriciales características de 63-50 KD y 37 KD, presentando estas matrices una banda adicional a 71 KD. 5. Marcadores de PM.

35

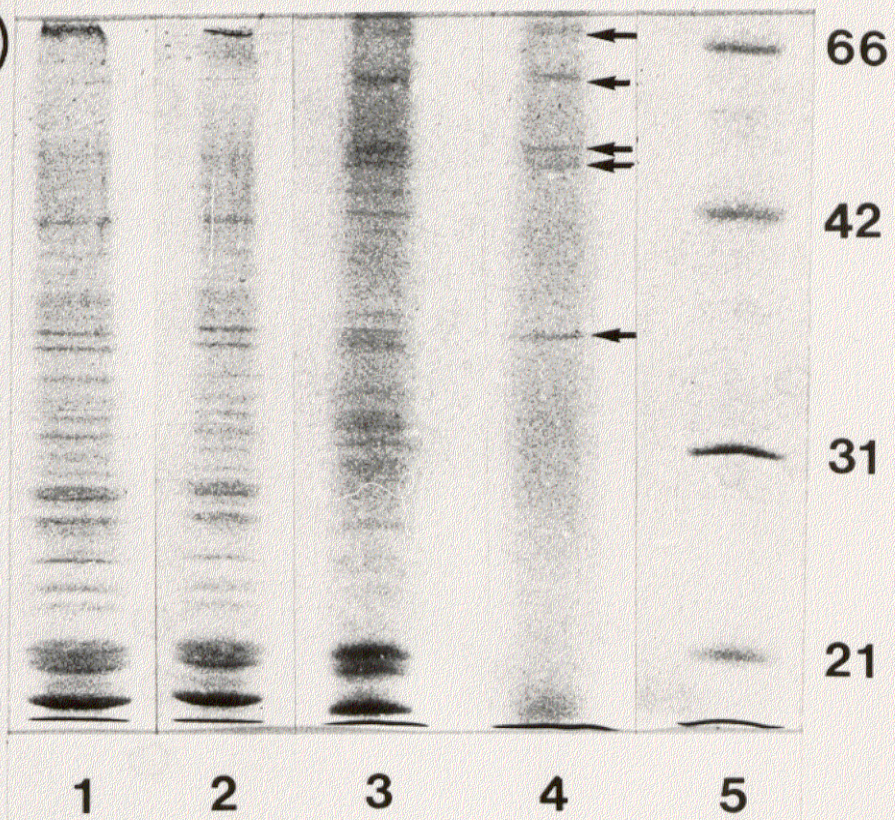
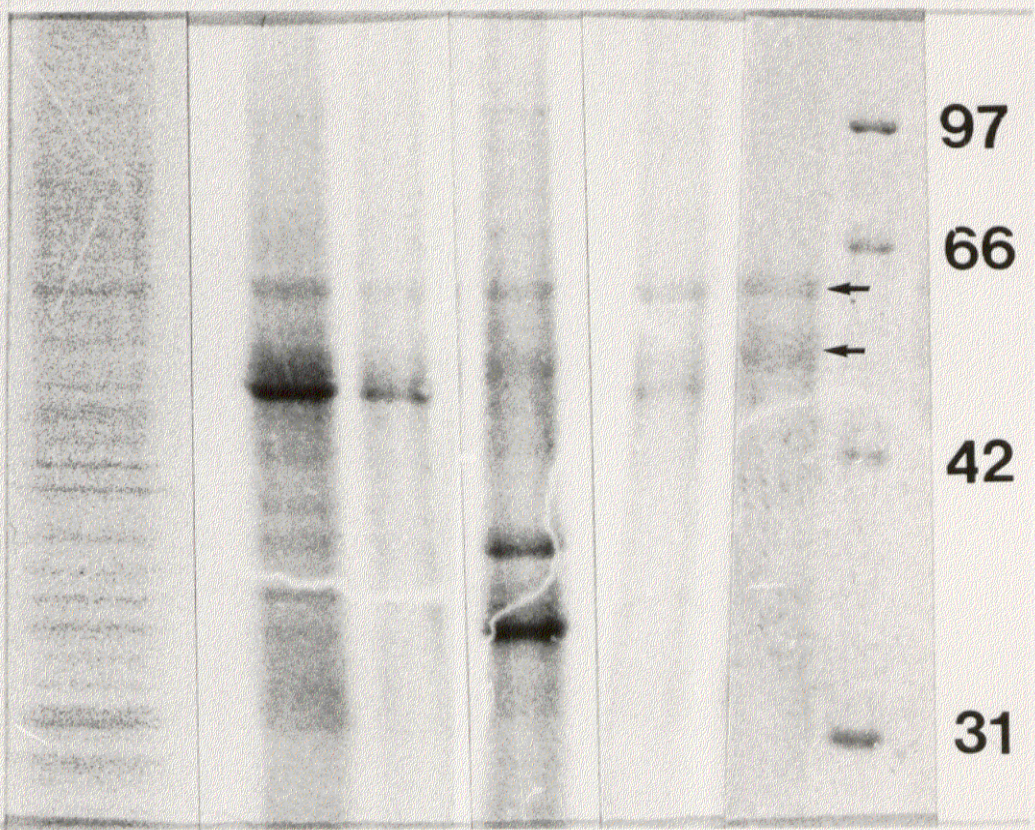


FIG.36 COMPOSICION POLIPEPTIDICA DE LA MATRIZ NUCLEAR Y DE LAS FRACCIONES NUCLEARES RESIDUALES OBTENIDAS POR EL PROC.II, a partir de núcleos aislados en ausencia de Dietil-piropiridato y Acetato de magnesio, en geles SDS-PAGE al 10% y teñidos con azul de Coomassie. 1.Núcleos aislados en medio "standard".2.Núcleos aislados en un medio de aislamiento carente de Dietil- piropiridato y acetato de magnesio. Presentan un perfil polipeptídico más extraído que los núcleos aislados en condiciones "standard", las bandas proteicas que aparecieran en la matriz final son mayoritarias en esta fracción.3. Fracción nuclear residual obtenida por extracción con Tritón X-100 al 0.5 %.4.Fracción nuclear residual obtenida por extracción con Tritón X-100 al 0.5% y digestiones enzimáticas con 250 μ gr/ml DNasa I y 250 μ gr/ml RNasaA.5.Fracción nuclear residual obtenida por extracción con Tritón X-100 al 0.5 % , digestiones enzimáticas con 250 μ gr/ml DNasa I y 250 μ gr/ml RNasa A y extracción final con 0.2 mM acetato de magnesio. 6. Matriz nuclear aislada sin DPC y acetato magnésico. Se detectan en ésta fracción 2 bandas matriciales características del rango 63-50 KD. Estas bandas estan presentes en los núcleos y en todas las fracciones residuales y son las únicas que permanecen, aparentemente, después de la extracción con 2M ClNa.7.Marcadores de Pm.

36



1

2

3

4

5

6

7

97

66

42

31

significativas de esta fracción bandas proteicas de mayor Pm (91-71 KD) y de menor Pm (30-28 KD). Se observan, así mismo, histonas en esta fracción.

La extracción con alta fuerza iónica (2 M ClNa) produce la fracción de matriz nuclear. El perfil electroforético de las matrices nucleares obtenidas por este procedimiento no difiere significativamente del de las obtenidas realizando las digestiones con nucleasas después de la extracción salina. La mayoría de las proteínas matriciales se detectan en el rango 63-50 KD (bandas 63, 54, 52, 50 KD) siendo también característica la banda de 37 KD (Fig. 35, carrera 4) y una banda adicional a 71 KD . Se observa una proporción de proteínas de bajo Pm (15-17 KD) en esta fracción.

Si se obtiene la matriz nuclear a partir de núcleos aislados sin dietil-pirocarbonato ni acetato de magnesio en el medio de aislamiento (Fig. 36). Los núcleos presentan un perfil polipeptídico más extraído que el de los núcleos aislados en condiciones "standard" (Fig. 36, comparar carreras 1 y 2), detectándose claramente en ellos las bandas proteicas de 63-50 KD que aparezcan en la matriz final, estas bandas se detectan en todas las fracciones residuales (Fig.36 carreras 3, 4, 5) y son las únicas que aparecen en la matriz nuclear aislada por este procedimiento (Fig.36 carrera 6).

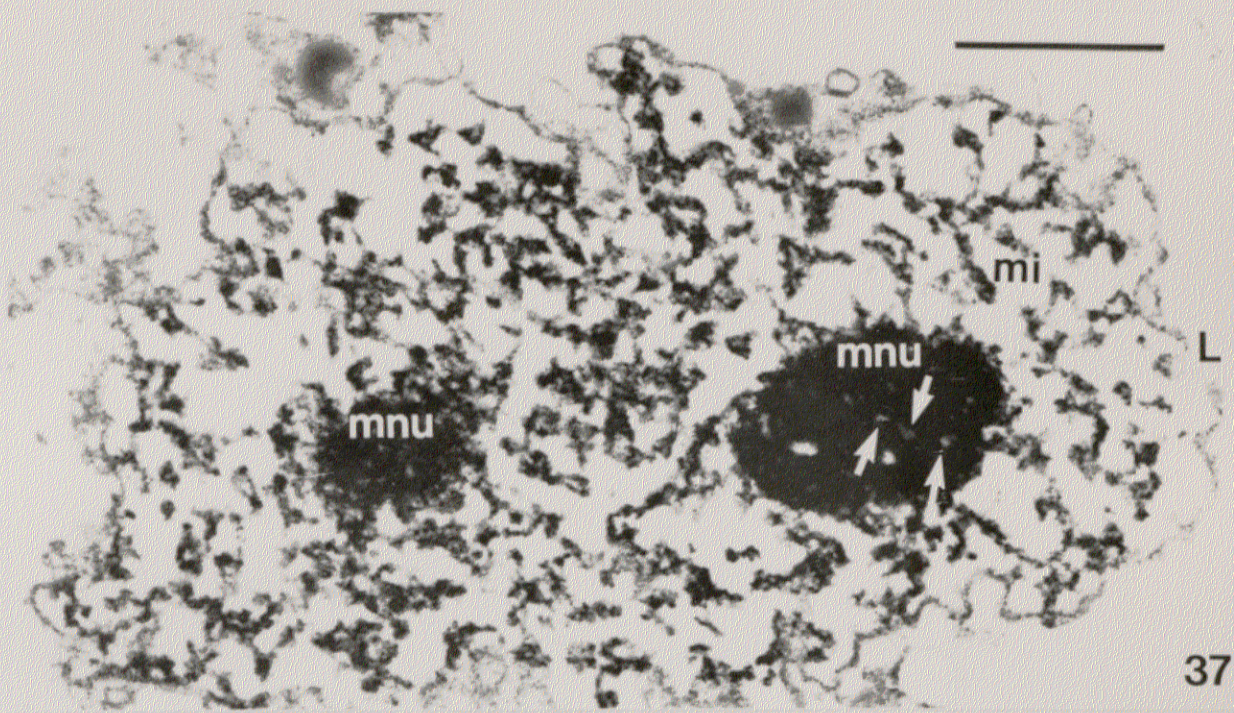
4. MATRICES NUCLEARES OBTENIDAS POR TRATAMIENTO CON TTNa y DTT (Proc. III).

Este tipo de matrices se han obtenido siguiendo el modelo de secuencia expuesto en el apartado anterior, es decir, realizando las digestiones enzimáticas antes de la extracción salina, pero se ha inducido oxidación reversible de grupos sulfhidrilo con TTNa después del aislamiento de los núcleos con el fin de evitar oxidaciones fortuitas

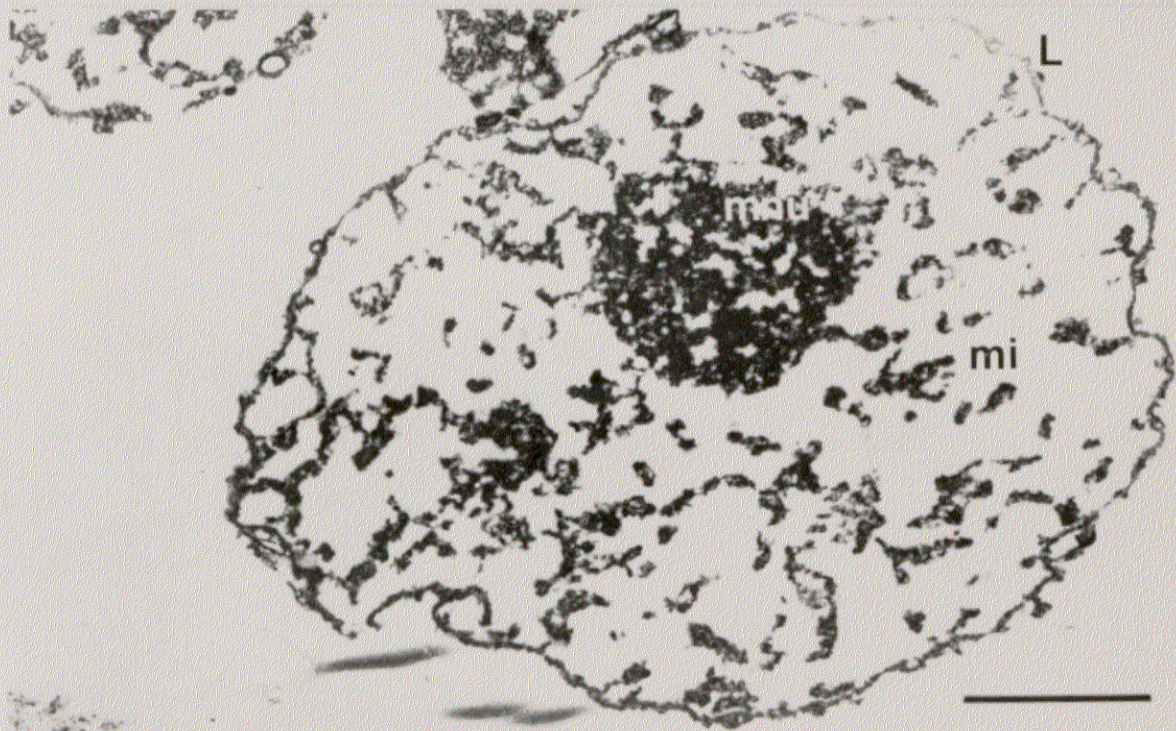
MATRICES NUCLEARES OBTENIDAS POR TRATAMIENTO CON TTNa Y DTT (PROC. III Y IV).

FIG.37 Matriz nuclear tratada con TTNa (PROC III), fijada en glutaraldehído-osmio y contrastada con acetato de uranilo-citrato de plomo. La principal modificación con este tratamiento se observa en la matriz nucleolar, que adquiere una organización muy compacta. Lámina (L), matriz interna (mi) y matriz nucleolar (mnu). En este último componente matricial se distinguen centros fibrilares (flechas blancas). x27.000. La barra representa 1 μ m

FIG.38 Matriz nuclear tratada con TTNa y reducida posteriormente con DTT (PROC IV), fijada en glutaraldehído-osmio y contrastada con acetato de uranilo-citrato de plomo. Después de la reducción con DTT la matriz nucleolar adquiere una organización fibrilar semejante a la de las matrices del PROC.II (FIG.25), asimismo disminuye la cantidad de matriz interna que se recupera en estas matrices. Lámina (L) , matriz interna (mi), matriz nucleolar (mnu). x24.500. La barra representa 1 μ m



37



38

entre proteínas nucleares durante el procedimiento de extracción. Al final de la extracción, se han reducido los puentes disulfuro con DTT (TABLA VII).

4.1 MORFOLOGIA Y ULTRAESTRUCTURA

MATRICES OBTENIDAS POR TRATAMIENTO CON TTNa

Las matrices obtenidas de núcleos incubados con TTNa, presentan una organización más compacta que las de las obtenidas por los otros procedimientos aunque su morfología de conjunto es similar, observandose los tres componentes: Lámina, matriz interna, y matriz nucleolar. La diferencia principal de este tratamiento respecto a las extracciones anteriores se observa en la matriz nucleolar que presenta una organización muy compacta y una alta densidad electrónica (Fig. 37); observandose asimismo una mayor abundancia de elementos de la matriz interna.

La lámina aparece con la misma organización que las obtenidas por los otros procedimientos. Presenta una estructura fibrilar compleja con fibras de 10 nm y en ella se encuentran integrados los poros complejos residuales (Fig. 39).

La organización de la matriz interna es similar a la de las matrices obtenidas según el procedimiento anterior (Proc. II), distinguiéndose los mismos tipos de mallas y gránulos que se describieron anteriormente, es decir, la malla fibrilar fina de fibras de aproximadamente 5 nm, la malla más densa con organización en zig-zag, y los gránulos de 25-30 nm (Fig. 40).

La matriz nucleolar presenta una organización compacta. En su interior se

reconocen los centros fibrilares con una densidad electrónica menor y con fibrillas de aproximadamente 5 nm en su interior (Fig. 41).

MATRICES OBTENIDAS POR TRATAMIENTO CON TTNa Y DTT.

Este tipo de matrices se ha obtenido a partir de las matrices anteriores por incubación de las mismas con el agente reductor DTT y extracción posterior con alta fuerza iónica (2 M ClNa) (TABLA VII).

Las matrices nucleares, después del tratamiento con DTT, son muy similares a las obtenidas mediante digestiones previas a la extracción salina (Proc.II). La reducción con DTT produce una descompactación del nucleolo residual, observándose también una disminución del material de matriz interna (Fig. 38).

La lámina aparece prácticamente inalterada respecto a las obtenidas antes de la reducción con DTT y mediante otros procedimientos de extracción (Figs. 9, 26, 39). Presenta una estructura fibrilar compleja con fibras de 10 nm y en ellas se encuentran integrados los poros residuales (Fig. 42).

La matriz interna aparece menos compacta que en las matrices oxidadas y con una organización muy similar a la de las matrices obtenidas realizando las digestiones previas a la extracción salina (Proc. II) (Fig. 28). En ella se observan la malla fibrilar de menor contraste a los electrones, y la densa con organización en zig-zag y los gránulos de 25-30 nm (Fig. 43).

FIG.39 Detalle a mayor aumento de la lámina (L) de una matriz nuclear tratada con TTNa (PROC III). Presenta una organización fibrilar formada por fibras de 5-10 nm y en ella se encuentran integrados poros complejos residuales (flechas). Se observan las conexiones de la lámina con la matriz interna (puntas de flecha).x46.170 La barra representa 1 μ m

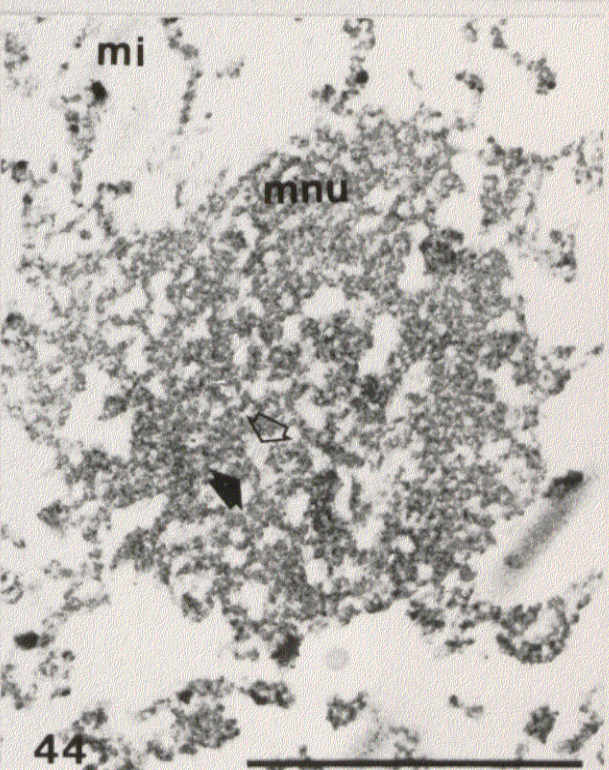
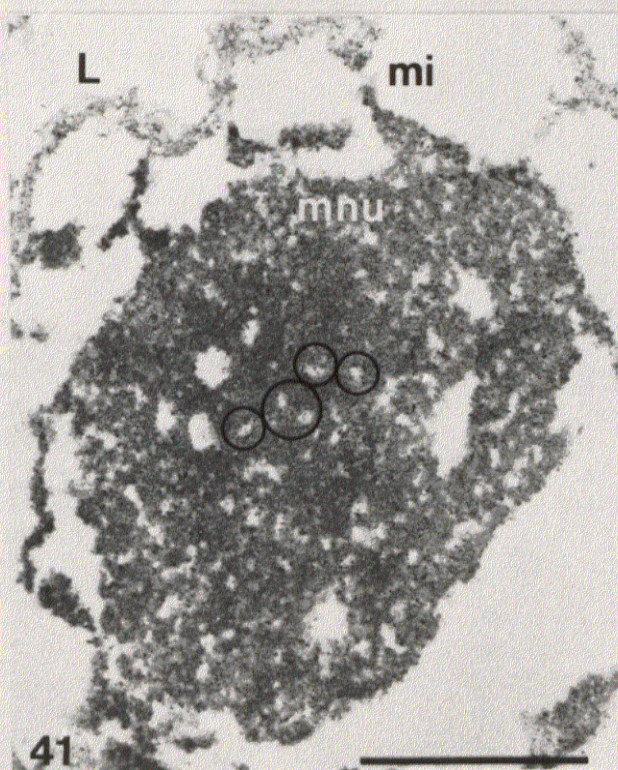
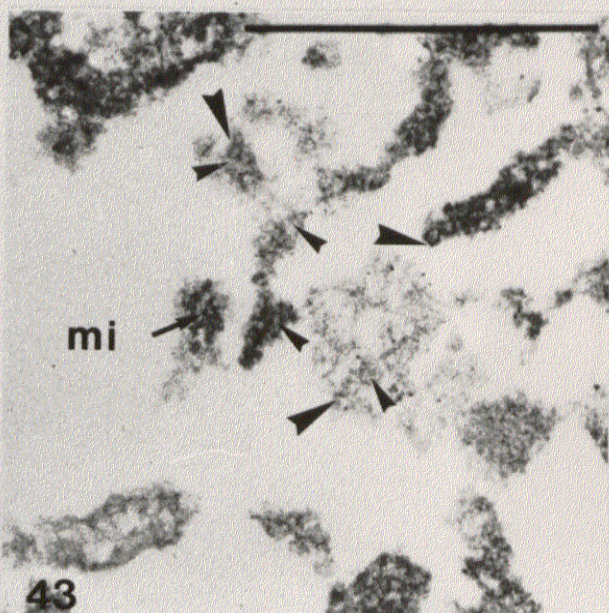
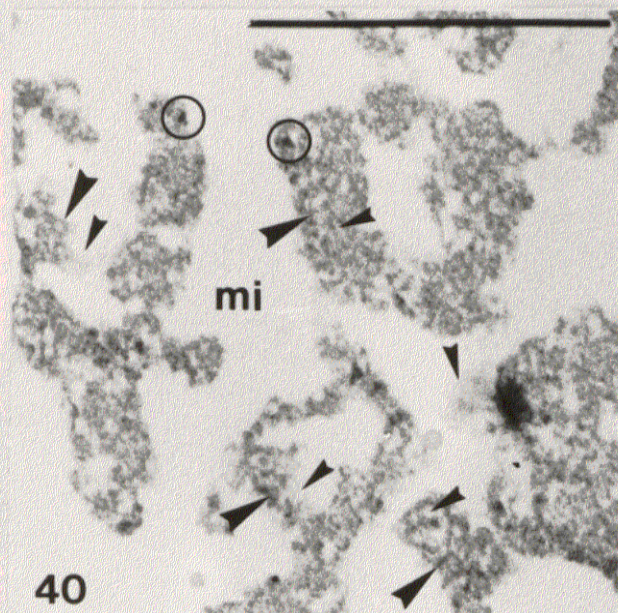
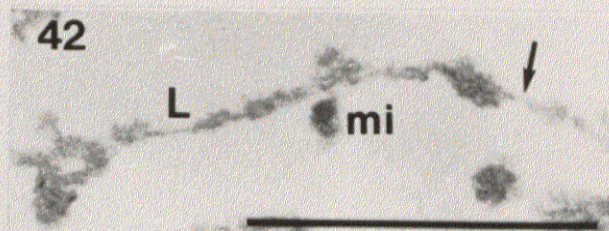
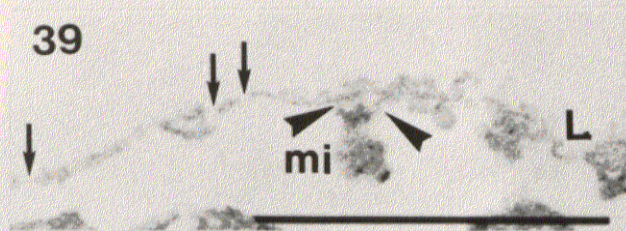
FIG.40 Detalle a mayor aumento de la matriz interna (mi) de una matriz nuclear tratada con TTNa (PROC.III).Presenta la misma organización que la matriz interna de las matrices obtenidas por el PROC II (FIGs 28 y 27). Se distinguen dos entramados fibrilares de diferente densidad electrónica (puntas de flecha) y gránulos de 25nm (círculos). x46.135. La barra representa 1 μ m

FIG.41 Detalle a mayor aumento de la matriz nucleolar (mnu) de una matriz nuclear tratada con TTNa (PROC III). Muestra una organización fibrilar compacta. Algunos centros fibrilares residuales se señalan encerrados con círculos. Lámina (L), matriz interna (mi). x30.780. La barra representa 1 μ m

FIG.42 Detalle a mayor aumento de la lámina (L) de una matriz nuclear tratada con TTNa y posteriormente reducida con DTT (PROC IV). Presenta la misma organización que las matrices tratadas con TTNa. La flecha señala un poro complejo residual.x46.170. La barra representa 1 μ m

FIG.43 Detalle a mayor aumento de la matriz interna (mi) de una matriz nuclear tratada con TTNa y posteriormente reducida con DTT (PROC IV). Presenta una estructura menos compacta que las matrices tratadas con TTNa. Se distinguen dos entramados fibrilares de diferente densidad electrónica (puntas de flecha grande y pequeña) y gránulos de 25-30 nm (flecha). x46.683. La barra representa 1 μ m

FIG.44 Detalle a mayor aumento de la matriz nucleolar (mnu) de una matriz nuclear tratada con TTNa y posteriormente reducida con DTT (PROC IV).Muestra una organización fibrilar similar a la de las matrices obtenidas por el PROC II (FIG 27). La flecha negra señala el entramado reticular y la flecha vacía fibras de menor contraste. x44.517. La barra representa 1 μ m



La matriz nucleolar es la estructura más sensible al tratamiento tanto con TTNa como con DTT. La oxidación de puentes disulfuro produce una gran compactación nucleolar y la reducción de los mismos por medio de DTT restaura la morfología típica de la matriz nucleolar del procedimiento II (Fig. 27). Está formada por fibrillas de 5 nm que a veces se estructuran en agrupaciones fibrilares más gruesas (15-25 nm) formando un entramado reticular que se extiende por todo el nucleolo y contacta con las fibras de la matriz interna adyacentes. En ese entramado reticular se observan fibrillas del mismo diámetro pero menor contraste a los electrones (Fig 44).

4.2 COMPOSICION POLIPEPTIDICA

MATRICES OBTENIDAS POR TRATAMIENTO CON TTNa

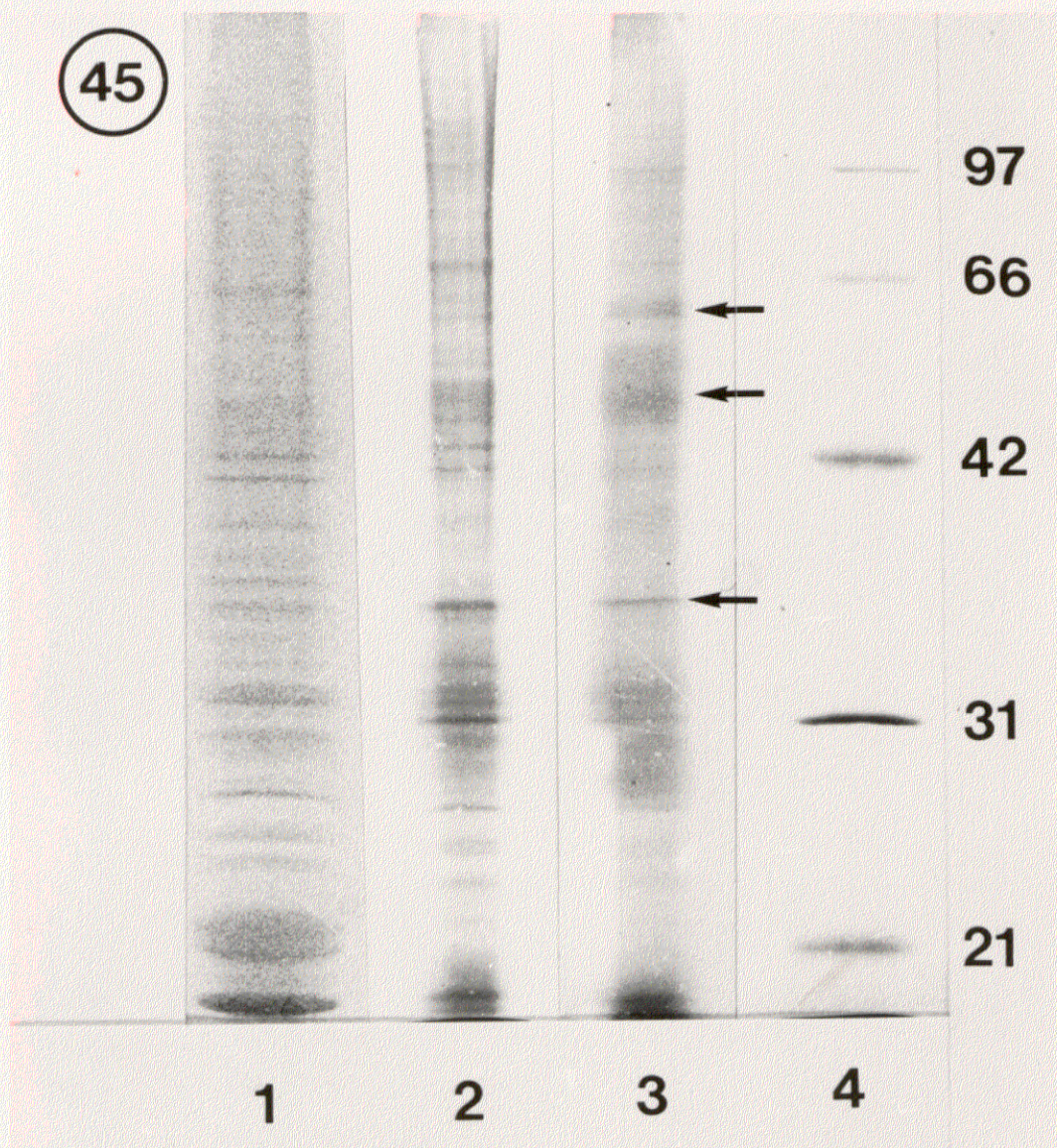
Las matrices obtenidas a partir de núcleos incubados con TTNa presentan un perfil electroforético heterogéneo con abundantes bandas cuyos Pms varían entre 137 y 17 KD (Fig. 45, carrera 2). Los geles muestran la retención de un gran número de bandas proteicas lo que indica que se ha producido un "cross-linking" amplio entre proteínas nucleares de forma que no quedan accesibles a la extracción.

Las bandas mayoritarias se detectan a 96, 82, 71, 54, 52, 50, 45, 43, 37, 30 y 25 KD, de las cuales serían proteínas matriciales características, la de 52, 50 y 37 KD (Figs. 35 y 45).

El perfil electroforético de estas matrices es diferente del de núcleos aislados, observándose una disminución de las bandas de 19 y 17 KD y un realzamiento de las proteínas matriciales de 52, 50 y 37 KD (Fig. 45).

FIG.45 COMPOSICION POLIPEPTIDICA DE LAS MATRICES NUCLEARES OBTENIDAS EN CONDICIONES DE OXIDACION-REDUCCION DE PUENTES DISULFURO, en geles SDS-PAGE al 10 % , teñidos con azul de Coomassie. 1.Núcleos.2. Matrices nucleares obtenidas a partir de núcleos oxidados con TTNa y realizando las digestiones enzimáticas antes de la extracción con 2M ClNa (PROC III). Presentan un perfil heterogéneo con numerosas bandas proteicas entre 137 y 17 KD.3. Matrices nucleares obtenidas siguiendo el procedimiento anterior pero añadiendo una extracción adicional con 2M ClNa y DTT 40 mM (PROC IV). Las flechas señalan las bandas proteicas comunes en todos los procedimientos de extracción de 63-50 KD y 37 KD.4.Marcadores de Pm.

45



MATRICES OBTENIDAS POR TRATAMIENTO CON TTNa Y DTT

Después de la reducción del "cross-linking", lo más notable del perfil polipeptídico de las matrices reducidas, es su similitud de conjunto con el de las matrices obtenidas por otros procedimientos (Fig. 50), al solubilizarse parte de las proteínas asociadas a las matrices TTNa (Fig.45, comparar carreras 2 y 3).

Las bandas proteicas mayoritarias se detectan en el rango 63-50 KD y a 37 KD (Fig. 45), lo que indica que se ha producido una reducción eficiente del "cross-linking" y confirma que estas proteínas (63-50 KD y 37 KD) son proteínas matriciales en este sistema. Estas matrices presentan también otros componentes de alto Pm (96, 82 y 71 KD) que no son mayoritarias en las matrices nucleares obtenidas por otros procedimientos, así como una proporción alta de proteínas de bajo Pm (19-17 KD).

5. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS DISTINTAS MATRICES

5.1 COMPARACION DE SU ULTRAESTRUCTURA

Las matrices nucleares, obtenidas a partir de los diferentes tratamientos (Figs 46, 47, 48 y 49), presentan la misma organización morfológica básica (TABLA IX). Están constituidas por la lámina, la matriz interna y la matriz nucleolar. Independientemente del método de extracción utilizado, los tres componentes matriciales tienen una organización ultraestructural semejante en las diferentes matrices. La lámina es una capa fibrilar (10 nm) con los poros residuales asociados; la matriz nucleolar es exclusivamente fibrilar y la matriz interna constituye un retículo fibrillogranular.

ESTRUCTURA COMPARADA DE LAS MATRICES OBTENIDAS POR LOS DISTINTOS PROCEDIMIENTOS , fijadas con glutaraldehído-osmio y contrastadas con acetato de uranilo-citrato de plomo.

FIG.46.Matriz nuclear(NM1) obtenida siguiendo el procedimiento clásico de BEREZNEY Y COFFEY (1974). x14.000.

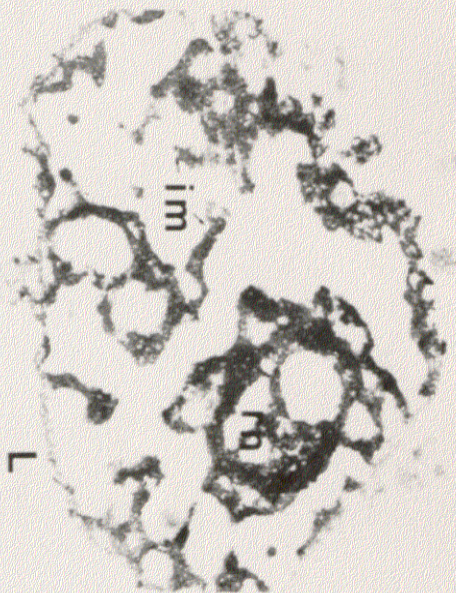
FIG.47.Matriz nuclear(NM2) obtenida realizando las digestiones enzimáticas antes de la extracción en alta fuerza iónica (PROC II). x22.000.

FIG.48. Matriz nuclear (NM3) oxidada con TTNa y obtenida realizando las digestiones enzimáticas antes de la extracción en alta fuerza iónica (PROC III). x17.000.

FIG.49.Matriz nuclear (NM4) oxidada con TTNa y reducida posteriormente con DTT, y obtenida realizando las digestiones enzimáticas antes de la extracción en alta fuerza iónica (PROC IV). x15.000. Las barras representan 1 μ m

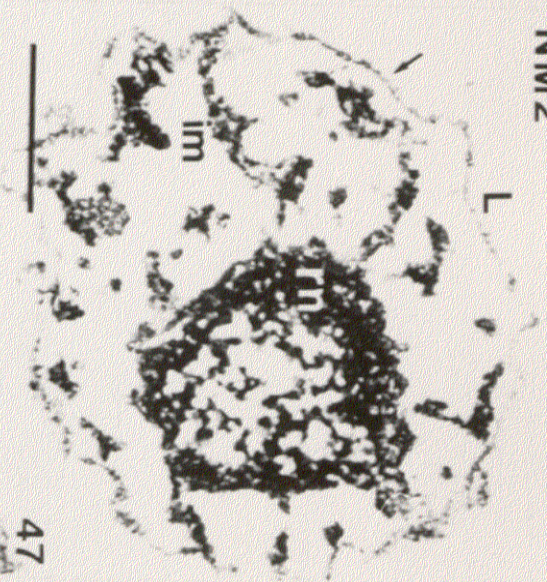
Las matrices obtenidas por los 4 procedimientos presentan lámina (L), matriz interna (im) y matriz nucleolar (rn). Las obtenidas por los PROC I y II muestran una ultraestructura muy similar. Las obtenidas por el PROC III contienen matrices nucleolares muy compactas y abundantes elementos internos; después de la reducción de puentes disulfuro (PROC IV), se restituye la morfología típica de las matrices obtenidas por los PROC I y II. Independientemente del procedimiento de extracción, las matrices presentan la misma organización morfológica básica. La lámina y la matriz interna no modifican su organización estructural, aunque éste último componente sea muy abundante en las matrices oxidadas con TTNa. La matriz nucleolar es el único componente matricial que se modifica estructuralmente después de la oxidación de puentes disulfuro.

NM1



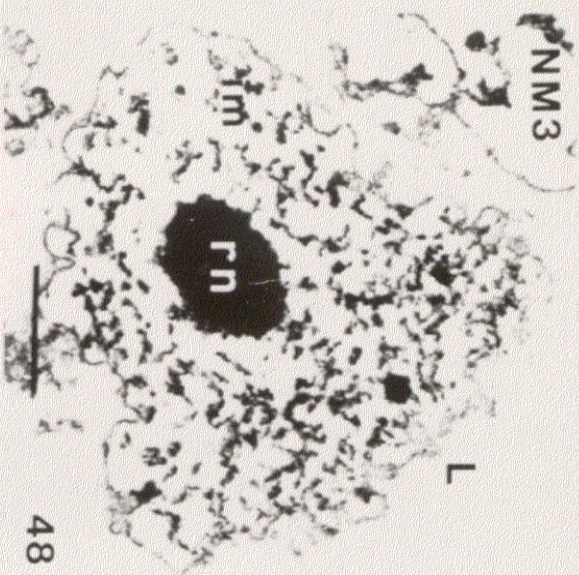
46

NM2



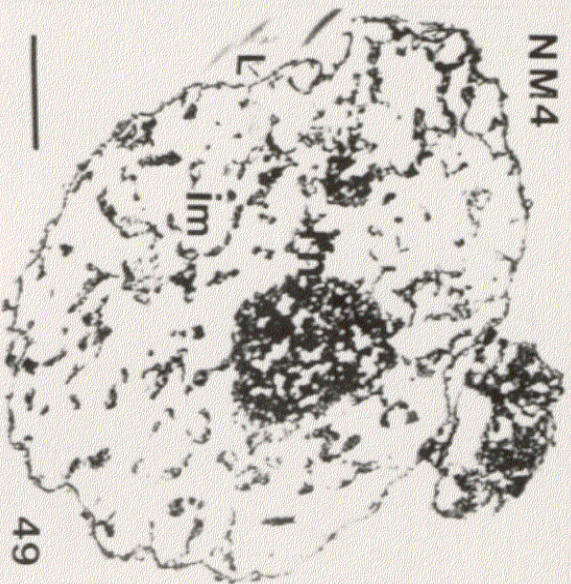
47

NM3



48

NM4



49

TABLA IX

COMPARACION ESTRUCTURAL DE LAS MATRICES NUCLEARES

	PROC.I	PROC.II	Núcleos sin DPC ni Mg	PROC.III	PROC.IV
LAMINA RES.	FIBRILAR-POROS RES.				
Fibras	10nm	10nm	≈4nm	10nm	10nm
MATRIZ INT.	FIBRILO-GRANULAR				
Fibras	10-20nm	5nm	≈4nm	5nm	5nm
		15nm	≈4nm	15nm	15nm
Gránulos	25-30nm	25-30nm	15-18nm	25-30nm	25-30nm
Matriz nucleolar	fibril.	fibril.	fibril.	compacta	fibril.
Fibras	15-20nm	5nm	≈4nm	-	5nm
Centros fibrilares	fibras 10nm	fibras 5nm	fibras ≈4nm	fibras 5nm	fibras 5nm

Los componentes de la matriz interna muestran un comportamiento diferencial dependiendo del procedimiento utilizado. Las mallas fibrilares son estructuras constantes en todas las matrices, pero las oxidadas con TTNa (Fig 48) contienen esos elementos en mayor cantidad, presentando las matrices obtenidas a partir de núcleos aislados sin DPC ni Magnesio una matriz interna escasa (Fig 33), constituida por fibras de diámetro menor ($\approx 4\text{nm}$). Los gránulos de 25-30 nm son también sensibles al procedimiento de extracción utilizado, aparecen como componentes constantes en todas las matrices, exceptuadas las obtenidas a partir de núcleos aislados sin DPC ni Magnesio en el medio de aislamiento (Fig 33).

El grado de extracción de la matriz nucleolar es altamente dependiente del procedimiento utilizado. Las matrices nucleolares obtenidas por el procedimiento de Berezney y Coffey (1974) y a partir de núcleos oxidados con TTNa son muy compactas y presentan bajos niveles de extracción (Figs. 10, 37 y 41). La digestión previa con nucleasas y la reducción de puentes disulfuro con DTT producen matrices nucleares mucho más extraídas (Figs. 25, 27, 44), presentando una estructura aún más extraída las matrices aisladas sin inhibidores de RNasas (Fig. 33). Se observan centros fibrilares en las matrices obtenidas a partir de cualquier procedimiento (Figs. 10, 27, 33 y 44).

5.2 COMPARACION DE SU COMPOSICION POLIPEPTIDICA

Los perfiles polipeptídicos de las matrices nucleares obtenidas en los cuatro procedimientos de extracción son complejos y varían de acuerdo con el procedimiento utilizado, revelando bandas con Pms comprendidos entre 137 y 17 KD (Fig. 50) (TABLA X). Las matrices resultantes de los procedimientos III y IV presentan mayor

COMPARACION DE LA COMPOSICION POLIPEPTIDICA DE LAS DISTINTAS MATRICES NUCLEARES

FIG.50 1. Matrices nucleares obtenidas por el pocedimiento de BEREZNEY Y COFFEY (1974) (PROC I).2. Matrices nucleares obtenidas realizando las digestiones enzimáticas previas a la extracción en alta fuerza iónica (PROC II).3.Matrices nucleares obtenidas a partir de núcleos oxidados con TTNa (PROCIII).4.Matrices nucleares obtenidas a partir de núcleos oxidados con TTNa y posterior reducción de puentes disulfuro con DTT (PROC IV).8:Marcadores de Pm.N:Núcleos.H:histonas Los perfiles polipeptídicos de las matrices nucleares obtenidas en los 4 procedimientos de extracción son complejos y varían de acuerdo con el procedimiento utilizado. Las matrices que presentan mayor número de bandas proteicas son las matrices TTNa (carrera 3). Los procedimientos I y II son los más extractivos (carreras 1 y 2). Las flechas negras señalan las bandas proteicas de 63-50 KD y de 37 KD comunes a los 4 procedimientos de extracción.

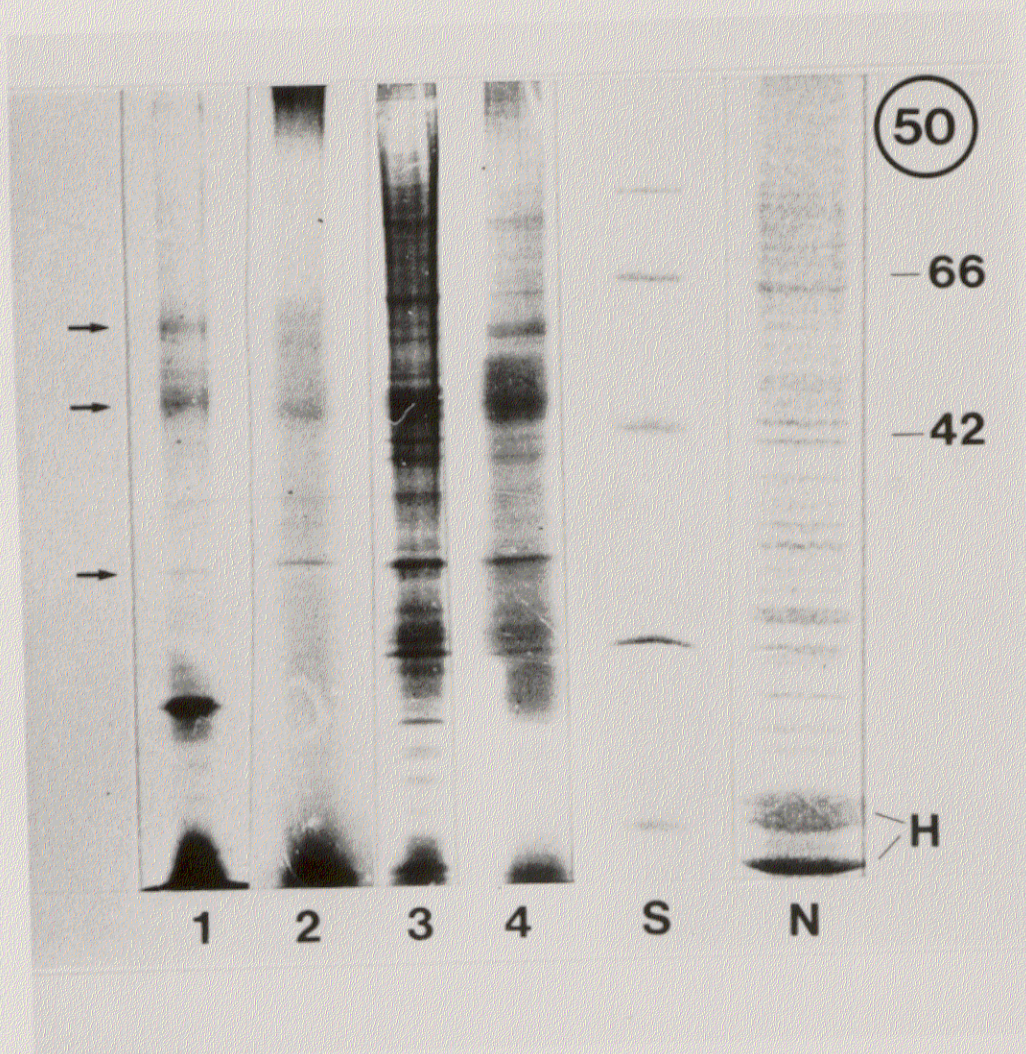


TABLA X

COMPARACION DE LOS PERFILES POLIPEPTIDICOS MATRICES NUCLEARES

PROC.I	PROC.II	sin DPC	PROC.III	PROC.IV
			137KD	
			133KD	
			122KD	
			96KD	96KD
			82KD	82KD
	71KD		71KD	71KD
63KD	63KD	63KD	63KD	63KD
54KD	54KD	54KD	54KD	54KD
52KD	52KD	-	52KD	52KD
50KD	50KD	50KD	50KD	50KD
			45KD	
			43KD	
37KD	37KD	-	37KD	37KD
			30.5KD	30.5KD
27KD			25.5KD	25.5KD
			23KD	
			21.5KD	
19KD	19KD		19KD	19KD
17KD	17KD		17KD	17KD

PROTEINAS COMUNES TODOS TRATAMIENTOS: 63, 54, y 50 KD.

número de bandas que las de los dos primeros que parecen ser mucho más extractivos.

Algunas de las bandas mayoritarias son constantes en todas las matrices, las más conspicuas son las de rango 63-50 KD y la de 37 KD de Pm. Una cierta proporción de proteínas de bajo Pm (14-17 KD) aparece en todas las matrices. Las matrices nucleares que presentan mayor número de bandas proteicas son las obtenidas a partir de núcleos tratados con TTNa, lo que está en consonancia con el "cross-linking" inducido en estas matrices y también con sus características estructurales ya que están constituidas por una matriz interna abundante y su matriz nucleolar presenta menor grado de extracción en relación al resto de las matrices. Las matrices nucleares con menor número de bandas proteicas son las obtenidas a partir de núcleos aislados sin DPC ni acetato de Magnesio, lo que está de acuerdo con la gran simplicidad estructural que se observa en estas matrices al M.E.. En su perfil polipeptídico (Fig 36) se observan bandas proteicas con Pms comprendidos entre 63-50 KD que son las proteínas comunes a todos los perfiles polipeptídicos de las matrices independientemente del método de extracción utilizado. El realizar las digestiones enzimáticas antes o después de la extracción con alta fuerza iónica, no parece afectar significativamente al perfil polipeptídico de las matrices finales, que presentan sus bandas características a 63-50 KD y a 37 KD, aunque la matriz obtenida por el método de Berezney y Coffey (1974) presenta una banda adicional a 25 KD y la obtenida realizando las digestiones enzimáticas previas a la extracción salina una banda adicional a 71 KD.

6. RECONSTRUCCION TRIDIMENSIONAL DE LA MATRIZ NUCLEAR

Se obtuvieron reconstrucciones tridimensionales de matrices nucleares a partir de bloques de cortes seriados consecutivos de matrices enteras que contienen sus tres

componentes: lámina, matriz nucleolar y matriz interna.

Los estereopares obtenidos, analizados con lupa estereoscópica, ponen en evidencia aspectos de las relaciones entre los distintos componentes matriciales que no pueden deducirse de la observación de cortes aislados.

Los estereopares producidos por el ordenador utilizando la información procedente de todos los cortes contienen demasiada información y no pueden ser analizados claramente. Para resolver este problema utilizamos dos estrategias: primero, en lugar de reconstruir todos los cortes de la matriz nuclear utilizamos bloques de menor número de cortes que contienen todas las estructuras cuyas relaciones queremos estudiar, y segundo, resumimos la información de cada tres cortes consecutivos en uno solo. El resumen de la información se hizo trazando el perfil externo resultante de superponer tres perfiles consecutivos y se introdujo en el ordenador junto con la profundidad proporcional del corte resumido que era la triple de la profundidad "standard". De esta manera se consiguió eliminar líneas ocultas y solapamientos sin perder información de ningún corte.

RELACIONES LAMINA-MATRIZ INTERNA-MATRIZ NUCLEOLAR

La figura 51 (a-j) corresponde a los 8 primeros cortes seriados consecutivos de una serie, de una matriz nuclear preparada por el procedimiento II. Los cortes se efectuaron perpendiculares a la lámina y seleccionando una zona de la matriz nuclear que contenía matriz nucleolar.

El estereopar de esta zona (Fig. 52) representa las relaciones existentes entre la

lámina (líneas negras), la matriz interna (líneas verdes) y la matriz nucleolar (líneas rojas). En él puede observarse como la lámina forma una estructura continua que envuelve a la matriz nuclear. La matriz nucleolar constituye una estructura discreta, compacta que no presenta contacto directo con la lámina, pero sí con la matriz interna en numerosos puntos de su periferia.

La matriz interna aparece formada por una red anastomosada de travéculas que conectan con la lámina y se extienden hacia el interior de la matriz conectando con la superficie nucleolar a diferentes niveles de su periferia.

RELACIONES LAMINA-MATRIZ INTERNA

La figura 53 (a-i) corresponde a los 9 últimos cortes seriados, perpendiculares a la lámina, de una serie de la matriz nuclear de la Fig. 51. Este bloque seriado pone de manifiesto principalmente las relaciones matriz interna-lámina. El estereopar correspondiente muestra que la lámina envuelve a la matriz nuclear y cómo los elementos de la matriz interna se anclan en la lámina extendiéndose por todo el interior de la matriz, formando una red anastomosada (Fig. 54).

7. ACIDOS NUCLEICOS EN LA MATRIZ NUCLEAR

7.1 FLUORESCENCIA: Doble marcado con DAPI y PIRONINA

Para controlar simultáneamente la eliminación de ADN y ARN de los núcleos residuales durante el procedimiento de extracción, se utilizó un doble marcado con DAPI y PIRONINA que permite una visualización rápida en microscopía de

fluorescencia del contenido de ADN (a 365 nm) y ARN (a 546 nm) de las sucesivas fracciones.

Después de la doble incubación DAPI-PIRONINA, los núcleos aislados observados a 365 nm (Fig. 55 b) aparecen como esferas brillantes de color violeta con los nucleolos sin contrastar. A 546 nm (Fig. 55 c) aparecen como esferas brillantes de color rojo intenso.

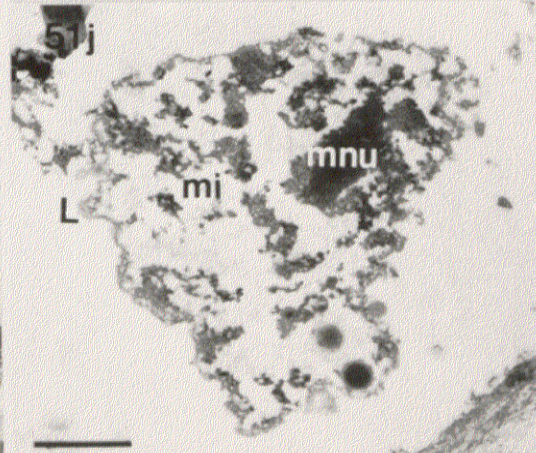
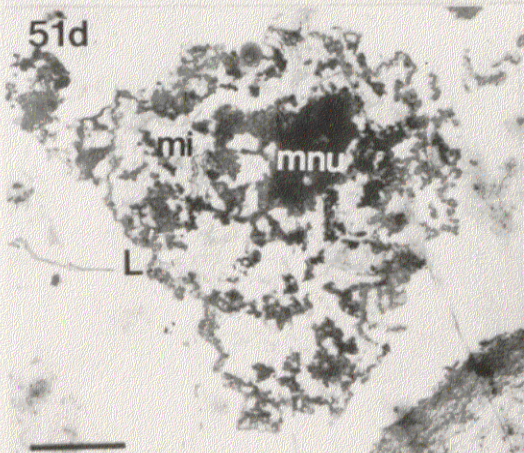
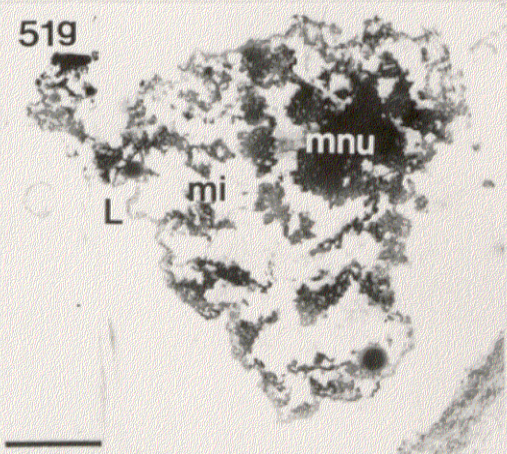
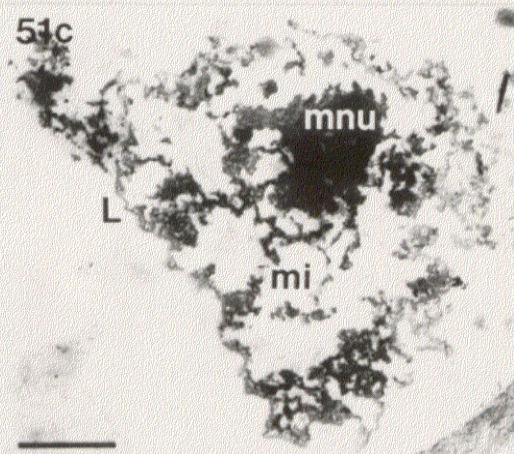
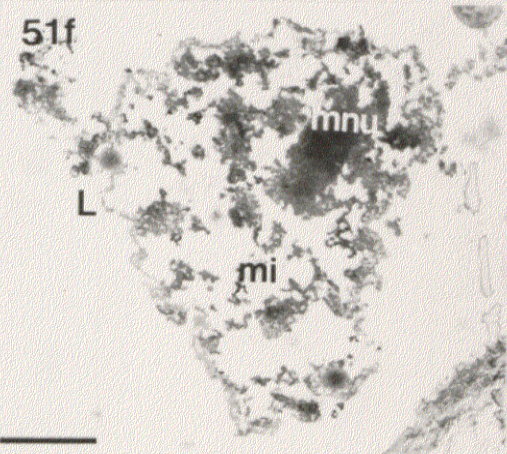
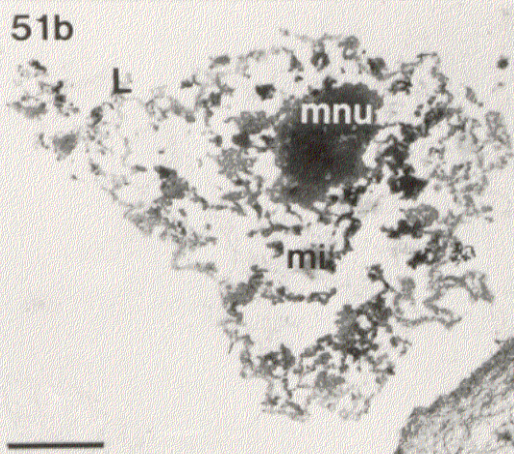
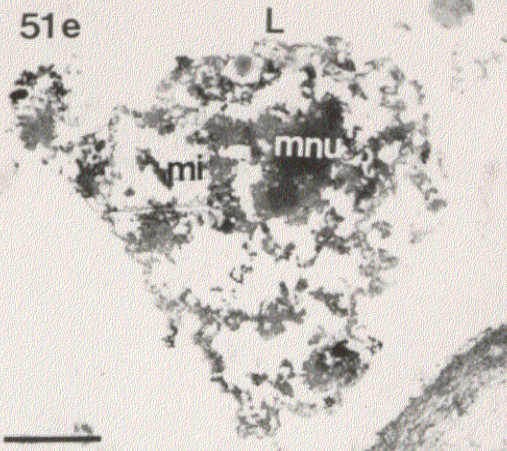
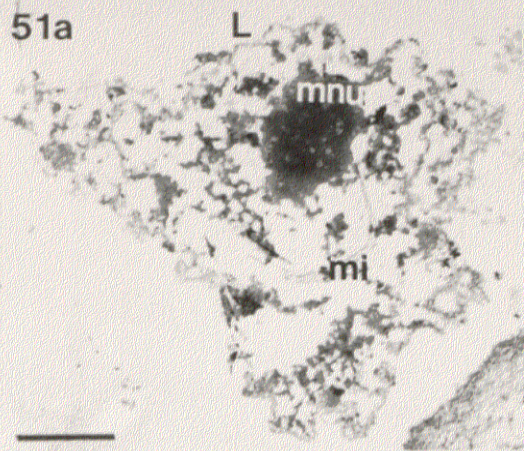
La extracción con Tritón X-100 (Fig. 56 a, b, c) no afecta el modelo de fluorescencia anteriormente expuesto, aunque la intensidad de fluorescencia es menor.

Tras digestión enzimática con DNasa 1 y RNasa A, los núcleos aparecen en contraste de fase (Fig. 57 a) con las regiones intercromatínicas claramente contrastadas y los nucleolos bastante densos. Observados a 365 nm (Fig. 57 b) se comprueba la disminución de fluorescencia de DAPI que queda confinada a puntos brillantes del nucleoplasma. A 465 nm (Fig. 57 c) se comprueba análogamente la disminución en el nucleoplasma de la fluorescencia de PIRONINA, los nucleolos aparecen ligeramente más contrastados.

Después de la extracción con 0,25 mM Cl_2Mg y 2M ClNa las matrices, que presentan en contraste de fase un aspecto reticulado con nucleolos residuales bien patentes (Fig. 58 a), prácticamente no fluorescen a ninguna de las dos longitudes de onda (Figs. 58 b y c), indicando la baja proporción de ácidos nucleicos que contienen.

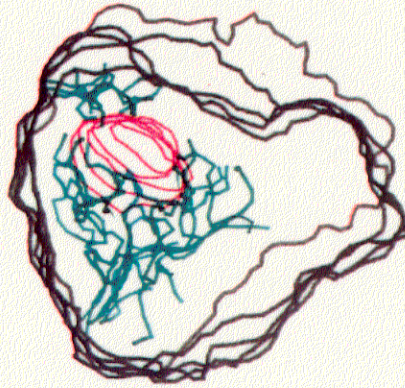
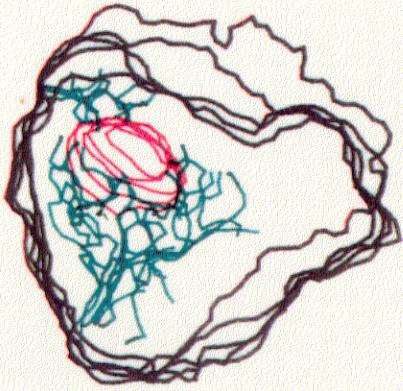
ORGANIZACION TRIDIMENSIONAL DE LA MATRIZ NUCLEAR: Cortes seriados de la matriz nuclear

FIG. 51a-j Se muestran 8 cortes seriados consecutivos de una serie correspondiente a una matriz nuclear, fijada en glutaraldehído-osmio y contrastada con acetato de uranilo-citrato de plomo. (L) Lámina. (mi) matriz interna. (mnu) matriz nucleolar. x12.400. La barra representa 1 μ m



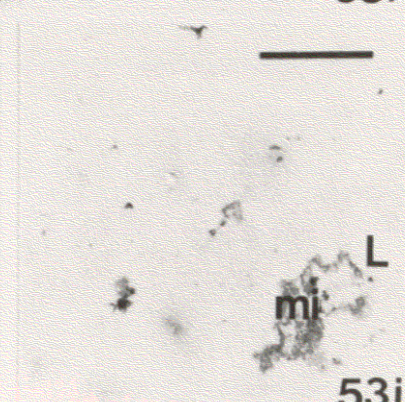
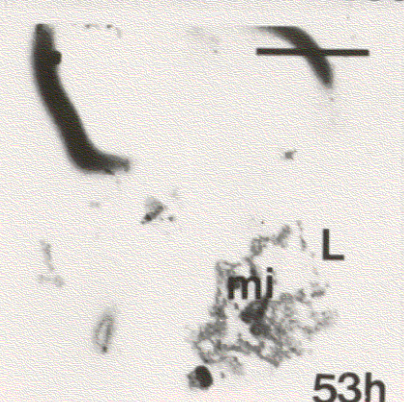
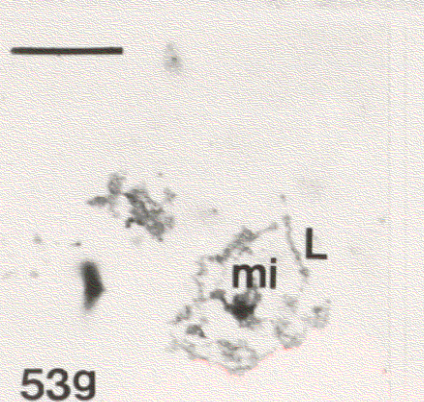
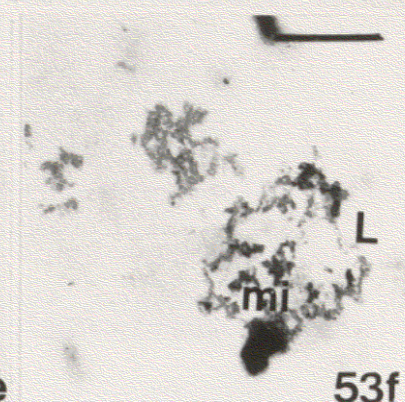
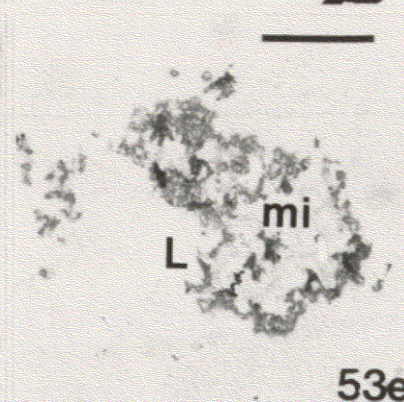
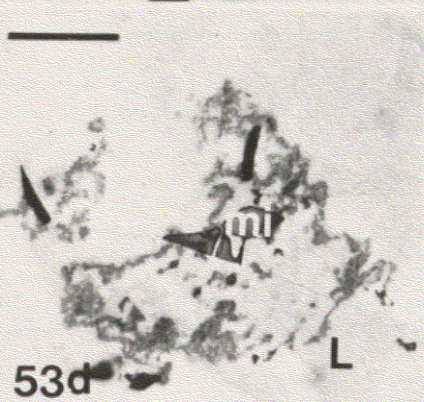
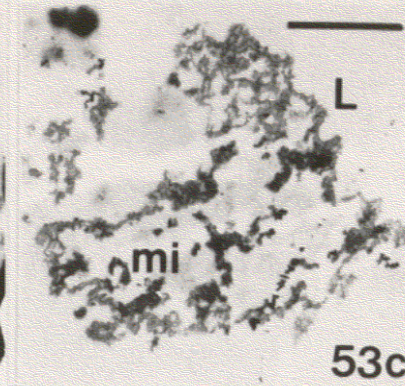
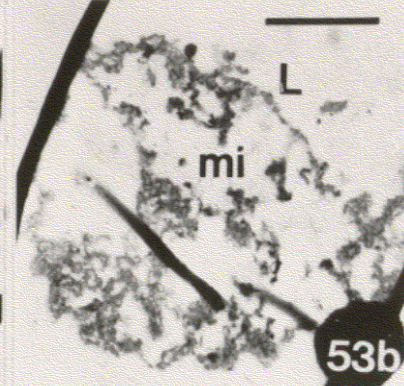
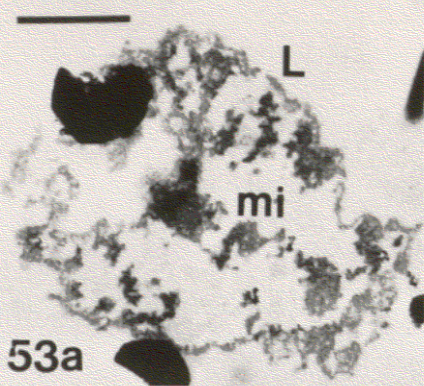
**ESTEREOPARES CORRESPONDIENTES a las FIGs 51a-j: Relaciones
LAMINA-MATRIZ INTERNA-MATRIZ NUCLEOLAR**

FIG.52 La lámina (líneas negras) forma una estructura continua que envuelve a la matriz nuclear. Las conexiones de la matriz interna (líneas verdes) con la lámina y la matriz nucleolar (líneas rojas) se mantienen en los diferentes niveles de profundidad del bloque seriado. La matriz nucleolar (líneas rojas) muestra una estructura ovalada que disminuye progresivamente en el interior de la matriz.



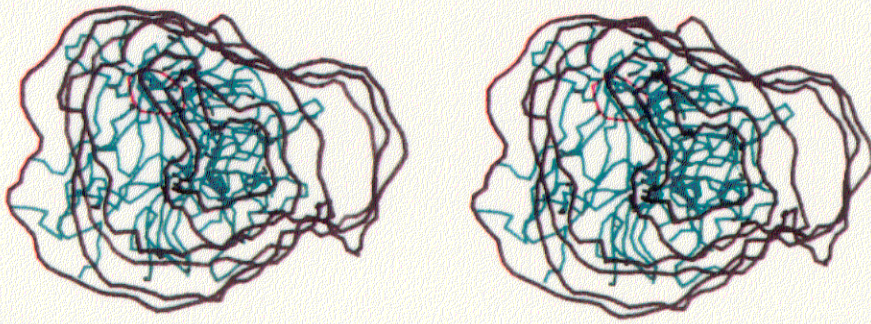
ORGANIZACION TRIDIMENSIONAL DE LA MATRIZ NUCLEAR : Cortes seriados de la matriz nuclear.

FIG.53a-i Se muestran los 9 cortes seriados consecutivos correspondientes a la parte final de la serie de la matriz nuclear de la FIG 51. En ellos se pone de manifiesto la interrelación entre la matriz interna (mi) y la lámina (L). x14.400. Las barras representan $1\mu\text{m}$



ESTEREOPARES CORRESPONDIENTES a la FIG 53a-i : Relaciones MATRIZ INTERNA-LÁMINA

FIG.54 La lámina (líneas negras) forma una estructura continua que envuelve a la matriz nuclear. La matriz interna (líneas verdes) mantiene las conexiones con la lámina en los diferentes niveles de profundidad del bloque seriado y forma una red anastomosada de travéculas que se extiende por todo el interior de la matriz. Matriz nucleolar (línea roja).



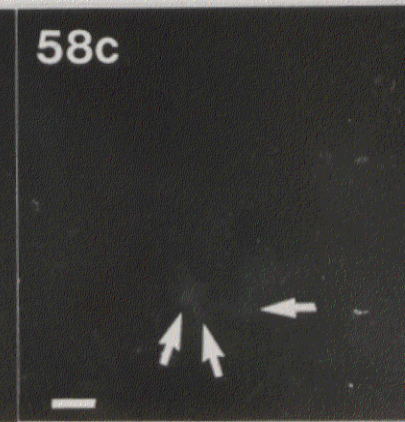
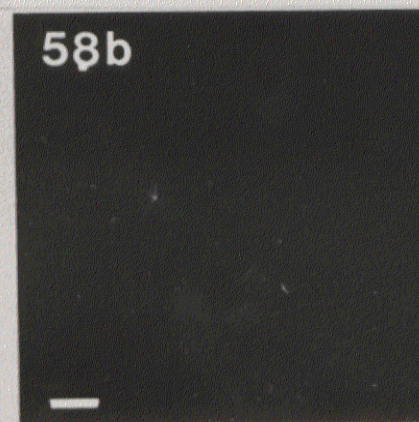
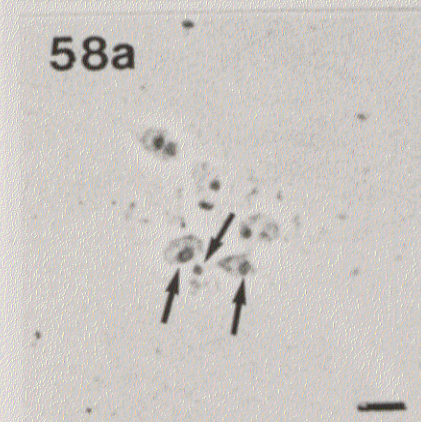
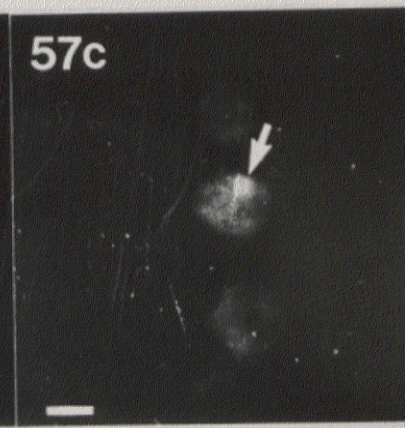
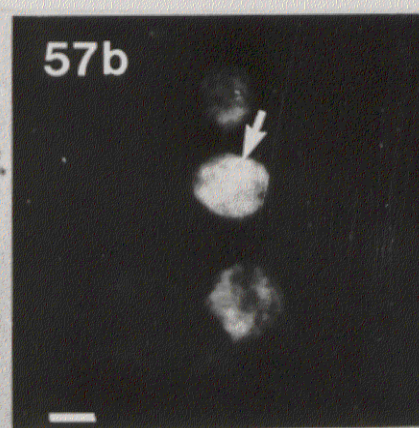
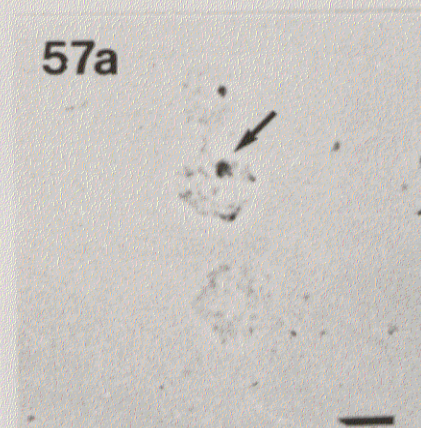
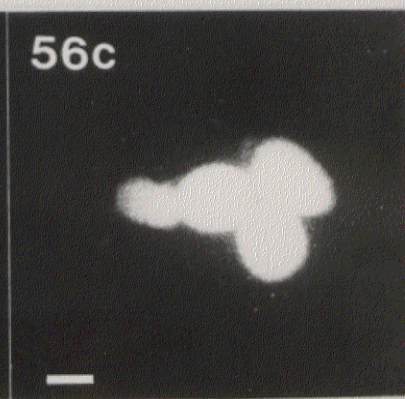
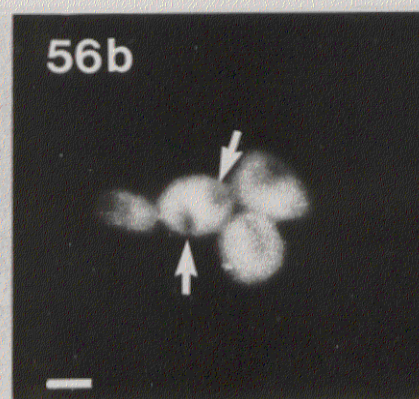
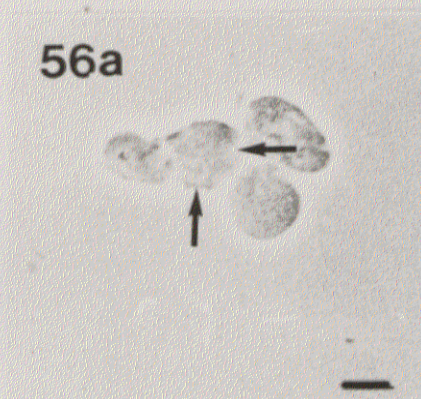
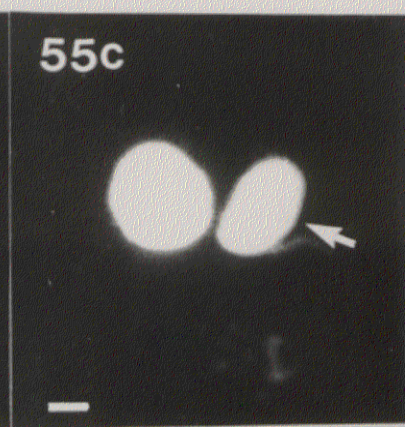
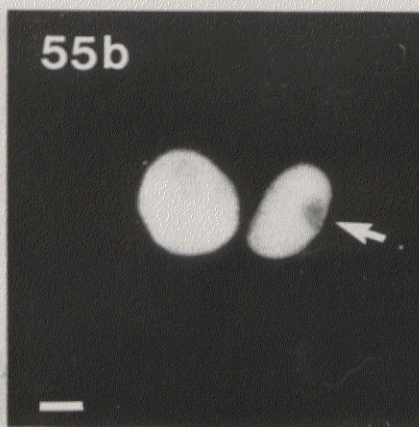
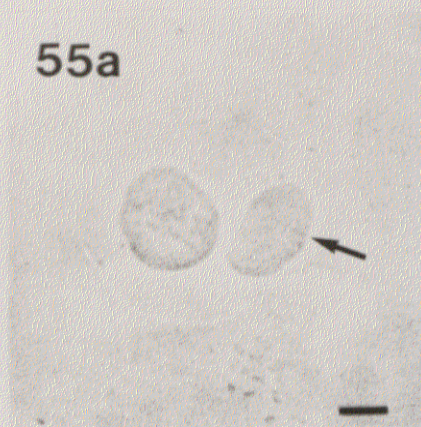
**ACIDOS NUCLEICOS EN LA MATRIZ NUCLEAR : fluorescencia
DAPI-PIRONINA**

FIG.55a Núcleos aislados en contraste de fase. Se señala un nucleolo con flecha negra. 55 b. Los mismos núcleos visualizados a 365nm , aparecen como esferas brillantes de color violeta excepto las áreas de los nucleolos (flecha blanca). 55 c. Los mismos núcleos visualizados a 546 nm , aparecen como esferas brillantes de color rojo. x544. Las barras representan 10 μ m

FIG.56a Núcleos aislados extraídos con Tritón X-100 y visualizados en contraste de fase. Algunos nucleolos se señalan con flechas negras. 56 b. Los mismos núcleos visualizados a 365 nm, aparecen como esferas brillantes de color violeta excepto los nucleolos (flechas blancas). 56 c. Los mismos núcleos visualizados a 546 nm , aparecen como esferas brillantes de color rojo. x544. Las barras representan 10 μ m

FIG.57a Núcleos aislados extraídos con Tritón X-100 al 0.5 % y digeridos con 250 μ gr/ml DNasa I y 250 μ gr/ml RNasa A visualizados en contraste de fase. Se señala un nucleolo con flecha negra. 57 b. Los mismos núcleos visualizados a 365 nm. La fluorescencia disminuye drásticamente respecto a la extracción anterior , siguen observandose oscuras las áreas de los nucleolos (flecha blanca). 57 c. Los mismos núcleos observados a 546 nm. Igualmente disminuye la fluorescencia debida a la Pironina con relación a la extracción anterior. Las áreas de los nucleolos muestran fluorescencia ligeramente superior en relación al nucleoplasma (flecha blanca). x544. Las barras representan 10 μ m

FIG.58a Matrices nucleares finales visualizadas en contraste de fase. Algunos nucleolos residuales se señalan con flechas negras. 58 b. Las mismas matrices no fluorescen practicamente a 365 nm. 58 c. Las mismas matrices observadas a 546 nm , la fluorescencia es prácticamente negativa. Las flechas negras señalan nucleolos residuales levemente fluorescentes. x544. Las barras representan 10 μ m



7.2 INMUNOLocalIZACION DEL ADN

NUCLEOS AISLADOS

Cuando se incuban con el anticuerpo monoclonal contra ADN, los núcleos aislados muestran un marcado muy fuerte y altamente específico (Fig. 59), análogo al que se produce con este mismo anticuerpo en los núcleos "in situ" (Martín y col. 1989). Los controles negativos aparecen siempre sin marcar (Fig.61).

Las partículas de oro decoran principalmente las masas de cromatina condensada, presentando una densidad de marcado muy alta (Fig. 59).

En el nucleolo el marcado es mucho más bajo y se detecta principalmente en los centros fibrilares y en el componente fibrilar denso que los rodea. Los centros fibrilares heterogéneos presentan una alta densidad de marcado comparable a la de las masas de cromatina extranucleolar, mientras que en los homogéneos es muy bajo. La zona del componente fibrilar denso más alejado de los centros fibrilares y el componente granular no presentan marcado significativo (Fig. 59).

En las regiones intercromatínicas el marcado es escaso.

MATRIZ NUCLEAR

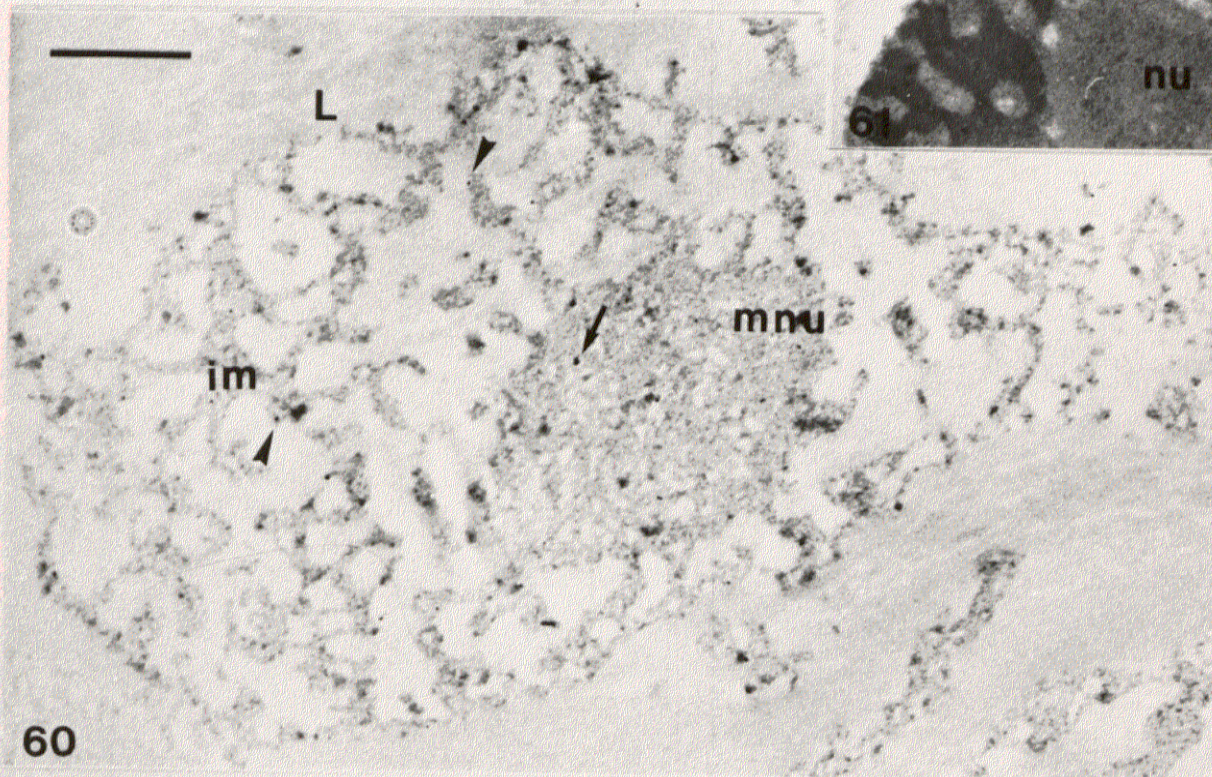
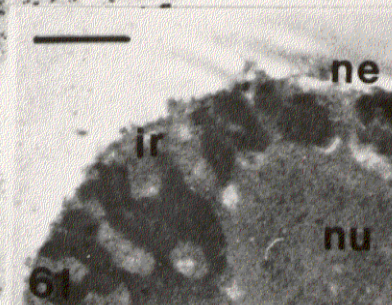
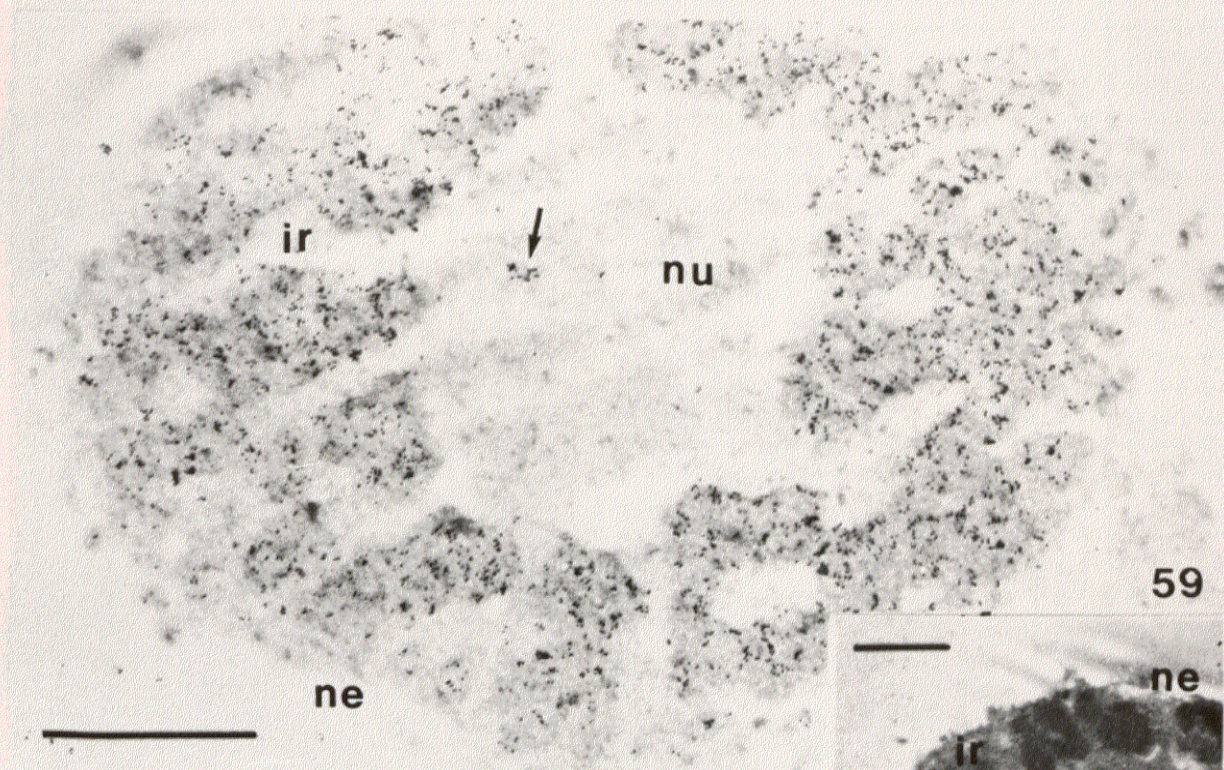
En la matriz nuclear el inmunomarcado es muy escaso comparado con el de núcleos aislados. Se detecta en los tres componentes matriciales, principalmente en la matriz interna y nucleolar, asociados con fibras bien en forma de granos de oro aislados, siguiendo un ordenamiento lineal o a veces en pequeños grupos (Fig. 60).

INMUNOLOCALIZACION DE ADN

FIG.59 Núcleo aislado fijado con paraformaldehído, incluido en resina acrílica e incubado con un anticuerpo monoclonal anti-ADN, revelado con un anticuerpo secundario anticonejo conjugado con partículas de oro de 10 nm. El inmunomarcado es altamente específico. La envuelta nuclear (ne) se halla desprovista de partículas de oro. Las masas de cromatina condensada presentan una densidad de marcado muy alta. En el nucleolo (nu) se muestra un centro fibrilar heterogéneo (flecha) con una densidad de marcado comparable a la de las masas de cromatina condensada. En las regiones intercromatínicas (ir) el marcado es muy bajo. X 28.000. La barra representa 1 μm

FIG.60 Matriz nuclear fijada con paraformaldehído , incubada con el mismo anticuerpo monoclonal anti-ADN. Se detecta un inmunomarcado escaso asociado principalmente a los elementos internos de la matriz. En la matriz interna (im) las partículas de oro están asociadas a fibras de 5 nm (punta de flecha). Algunas partículas de oro señalan también ADN matricial (flecha) en la matriz nucleolar (mnu) y en la lámina (L). X 18.000. La barra representa 1 μm

FIG.61 Control negativo. Los núcleos aislados incubados en las mismas condiciones omitiendo el anticuerpo primario en el tampón de incubación no presentan marcado, indicando la ausencia de reacciones inespecíficas del anticuerpo secundario. (ir) región intercromatínica, (nu) nucleolo, (ne) envuelta nuclear. X 1.200. La barra representa 1 μm .



En la matriz interna el inmunomarcado aparece asociado con fibras de 5 nm, tanto en la periferia como en el interior de las masas que forman el retículo fibrilar. No se han observado partículas de oro sobre los gránulos de la matriz interna.

Los controles negativos, al igual que sucede con los núcleos, no aparecen nunca marcados .

7.3 TINCION PREFERENCIAL PARA RIBONUCLEOPROTEINAS

Los núcleos aislados, después de tinción regresiva con EDTA, presentan blanqueadas las masas de cromatina condensada mientras que los nucleolos y ciertas estructuras de las regiones intercromatínicas aparecen preferencialmente contrastadas (Figs. 4 y 5). En las regiones intercromatínicas aparecen claramente contrastados los gránulos de 40-45 nm y 25-30 nm y fibras de 5-7nm (Fig. 5; Tabla XI).

En la matriz nuclear, al no poseer grandes masas de cromatina, es muy difícil observar el blanqueamiento del ADN residual. La lámina no aparece contrastada. La matriz nucleolar que es exclusivamente fibrilar muestra una tinción homogénea (Fig 64), excepto los centros fibrilares que se revelan como zonas claras en su interior. En la matriz interna aparecen diferencialmente contrastados los gránulos respecto de los componentes fibrilares (comparar Figs. 62 y 63). Los gránulos de 25-30 nm y otros de menor tamaño (10-15 nm) que forman polipartículas, aparecen claramente destacados de la red fibrilar fina a la que se encuentran asociados. Esta red fibrilar presenta un contraste menor que el de los gránulos asociados y el de las fibras de la matriz nucleolar (Figs. 63, 64 y 65; Tabla XI).

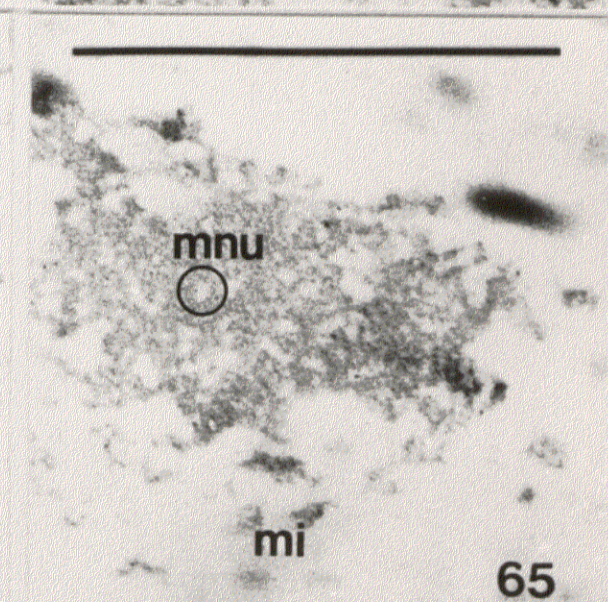
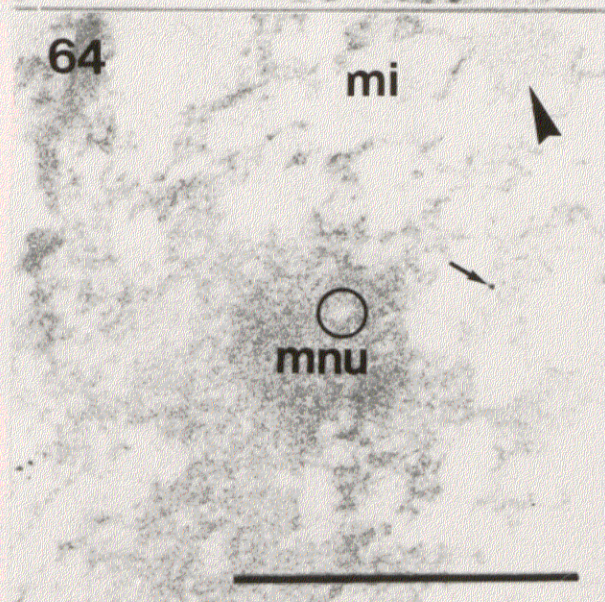
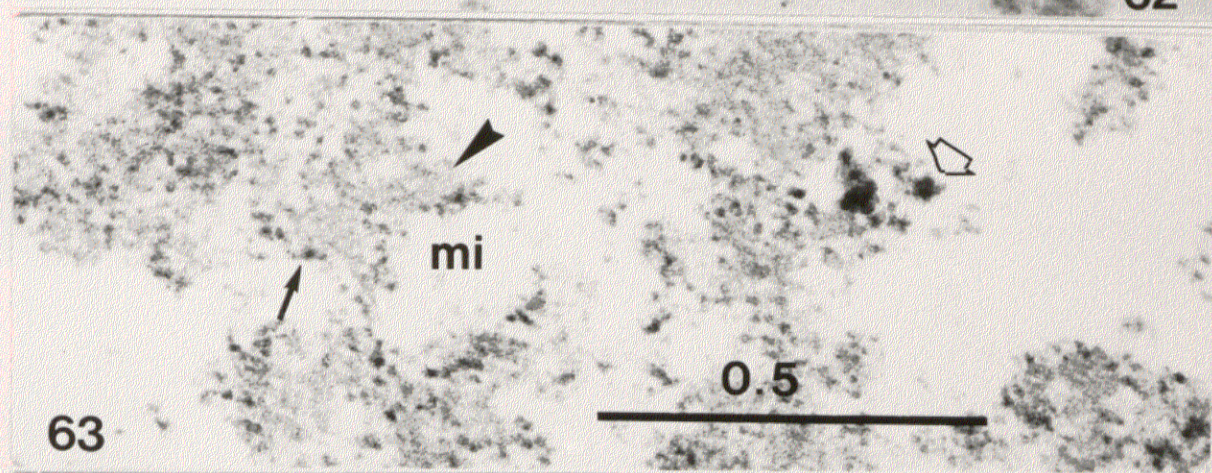
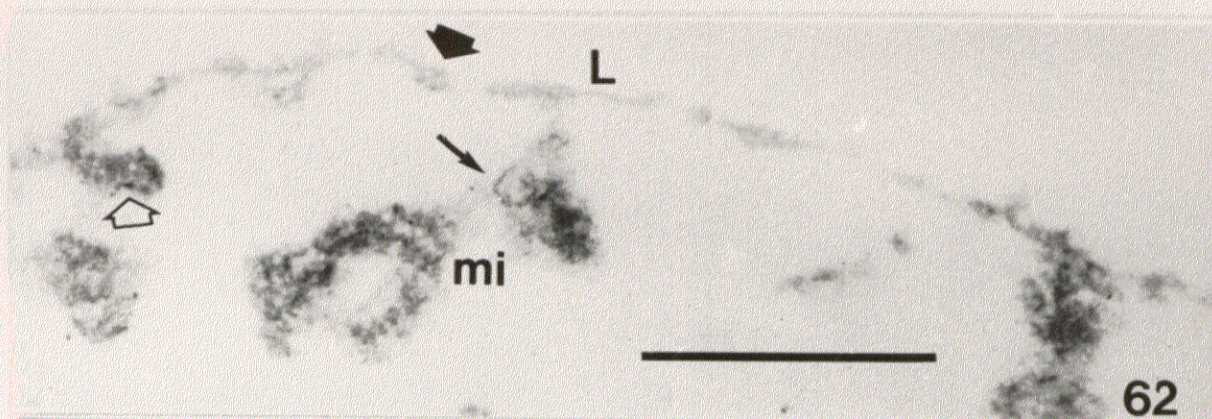
TINCION PREFERENCIAL PARA RIBONUCLEOPROTEINAS

FIG.62 Detalle de una matriz nuclear fijada en glutaraldehido-osmio y contrastada con acetato de uranilo-citrato de plomo. Se observa la lámina (L) con poros complejos residuales (flecha negra) y las conexiones de la lámina con la matriz interna (mi); en ésta última son visibles gránulos de 10 nm que forman polipartículas (flecha negra delgada) y otros de mayor tamaño (flecha blanca vacía). x38.500. La barra representa 1 μm

FIG.63 Detalle a mayor aumento de la matriz interna (mi) de una matriz nuclear contrastada con EDTA. La tinción preferencial contrasta gránulos de 10 nm que forman polipartículas (flecha negra) y otros de mayor tamaño (25-30 nm) (flecha vacía). La porción fibrilar no aparece preferencialmente contrastada con ésta tinción (punta de flecha). x100.000. La barra representa 0.5 μm

FIG.64 Detalle de la matriz nucleolar (mnu) de una matriz nuclear contrastada con EDTA. Este componente matricial muestra una tinción homogénea excepto las áreas correspondientes a los centros fibrilares residuales (círculo) que aparecen como zonas claras. En las regiones correspondientes a la matriz interna (mi) aparecen preferencialmente contrastados los gránulos de 25 nm (flecha negra) pero no los entramados de fibras (punta de flecha). x45.000. La barra representa 1 μm

FIG.65 Matriz nucleolar (mnu) contrastada con acetato de uranilo y citrato de plomo. Se observan los centros fibrilares residuales (círculo) y en su interior fibras de 4 nm. Matriz interna (mi). x 64.000



7.4 TINCION CON OXINITRATO DE BISMUTO

La tinción con oxinitrato de bismuto muestra una gran selectividad en los núcleos aislados como vimos anteriormente (Figs.7, 7a). Las únicas estructuras contrastadas son los gránulos de 25-30 nm en las regiones intercromatínicas y una red fibrilar fina (fibras de aproximadamente 4 nm) observable en el componente fibrilar denso del nucleolo (Figs. 7 y 66; Tabla XI).

Estos dos componentes aparecen claramente identificados por la tinción en las matrices nucleares, indicando, por tanto, que son resistentes a las extracciones (Fig. 67).

La tinción de la matriz nucleolar se produce sobre fibras discretas de aproximadamente 4 nm, distribuidas por el nucleolo residual aunque no de forma homogénea, ya que algunas áreas aparecen sin contrastar.

En la matriz interna se contrastan los gránulos de 25-30 nm, pero no los de menor tamaño ni las mallas fibrilares que la componen (Fig. 67).

La lámina no se contrasta con esta tinción.

TINCION CON OXINITRATO DE BISMUTO: Detección de gránulos intercromatínicos y proteínas fosforiladas nucleolares

FIG.66 Detalle a gran aumento de un núcleo aislado, fijado en glutaraldehído al 6 % , sin post-fijación en ácido ósmico e impregnado exclusivamente con oxinitrato de Bismuto. Las únicas estructuras contrastadas son los gránulos de 25-30 nm en las regiones intercromatínicas (punta de flecha) y fibras de ≈ 4 nm (flecha) alrededor de los centros fibrilares y distribuidas por el componente fibrilar del nucleolo (Nu). El positivo está forzado de exposición para visualizar las masas de cromatina condensada (chr). x40.000. La barra representa $1\mu\text{m}$

FIG.67 Detalle a gran aumento de una matriz nuclear fijada en glutaraldehído al 6%, sin post-fijación en ácido ósmico e impregnada con oxinitrato de Bismuto. La tinción contrasta fibras de aproximadamente 4 nm (flecha negra) en la matriz nucleolar (mnu) y gránulos de 25-30 nm (puntas de flecha negra) en la matriz interna (mi). El positivo está forzado de exposición para realzar las fibras de la matriz interna (punta de flecha vacía) y las fibras nucleolares (flecha negra grande) que aparecen desprovistas de tinción. x45.000. La barra representa $1\mu\text{m}$

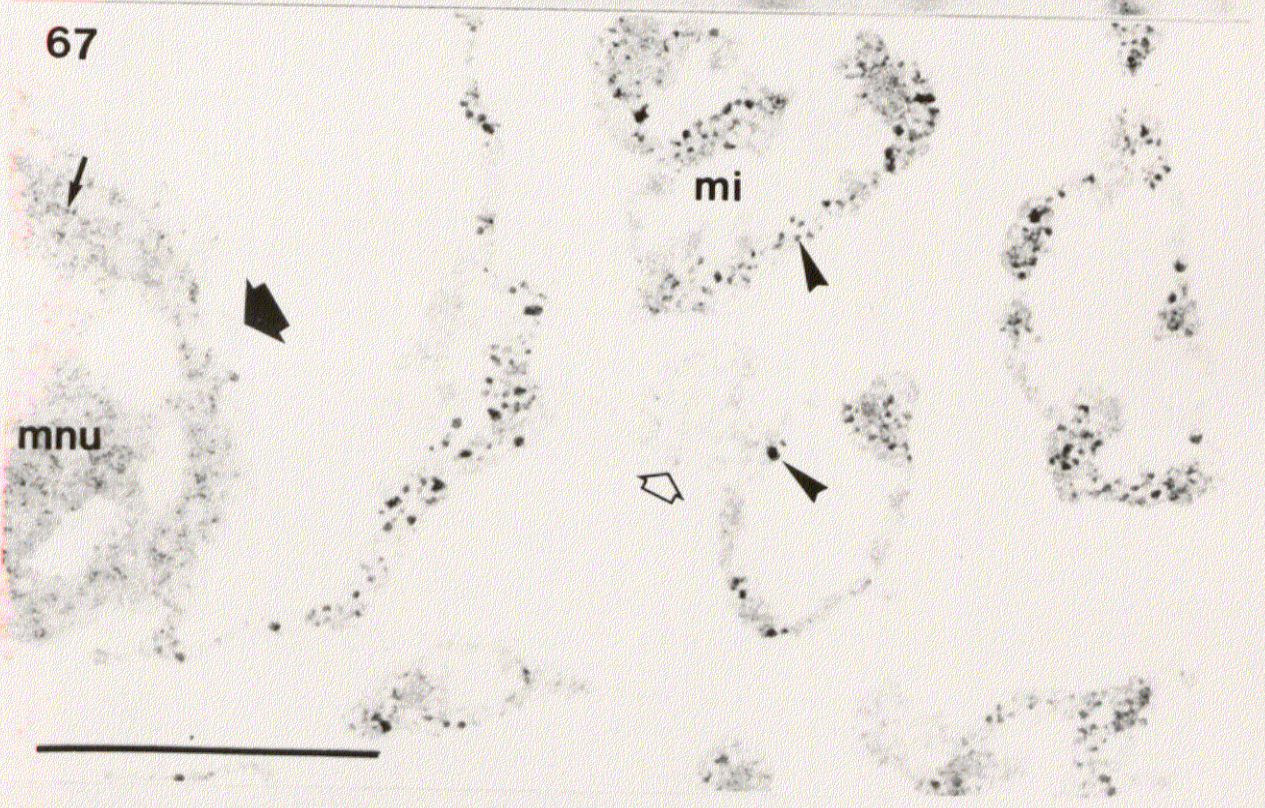
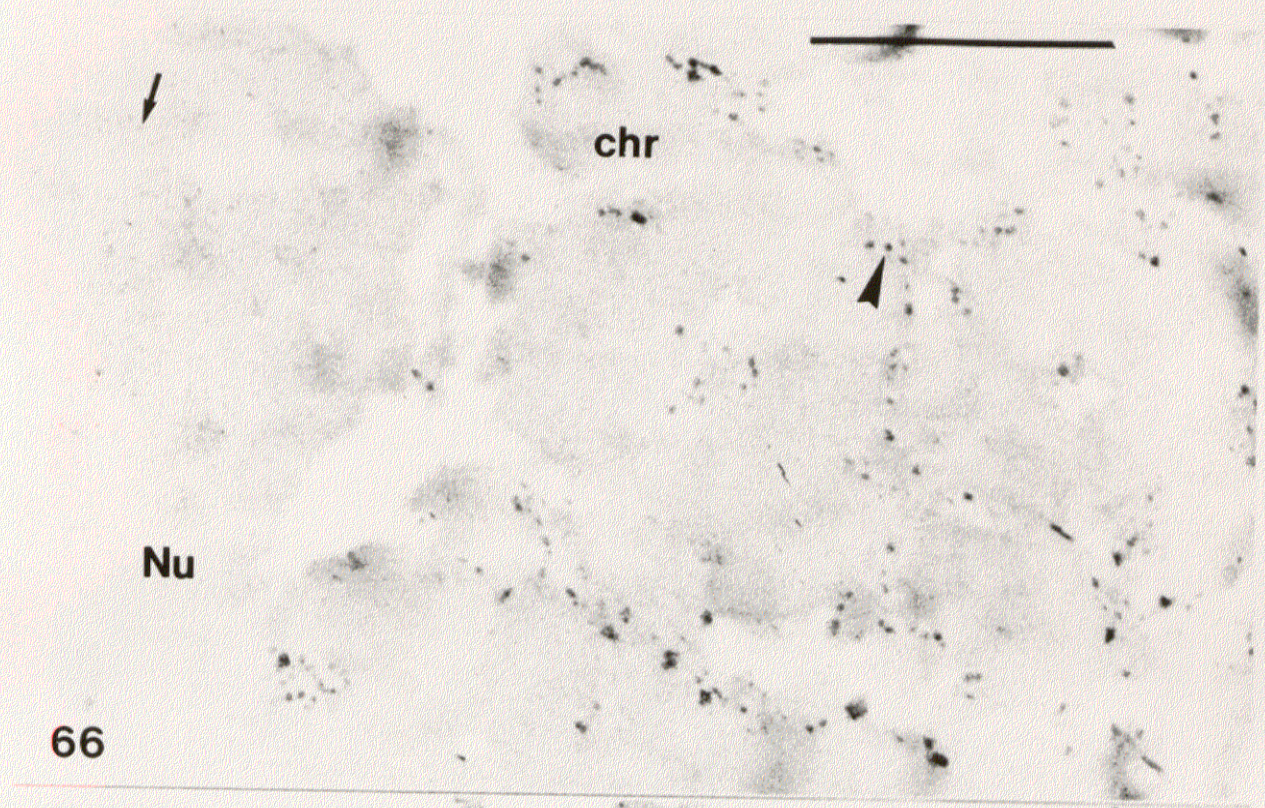


TABLA XI

	NUCLEOS uranilo-plomo	EDTA	Bismuto
envuelta nuclear	+	-	-
Masas de cromatina condensada	+	-	-
R.intercromatínica			
Gránulos 40-45nm	+	+	-
Gránulos 25-30nm	+	+	+
Fibras	+	+ parte de ellas	-
Nucleolo	+	+ (excepto centros fibrilares)	(solo fibras 4nm +)

TABLA XI

MATRICES uranilo-plomo		EDTA	Bismuto
Lámina	+	no se contrasta preferencialmente	-
Matriz interna			
Gránulos 25-30nm	+	+	+
Gránulos 10-15nm	-	+	-
Fibras 5-15nm	+	no se contrastan preferencialmente	-
Matriz nucleolar			
Fibras 5nm	+	se contrastan homogéneamente (excepto centros fibrilares)	(+) sólo parte de ellas

DISCUSION

1 DISTINTOS METODOS DE OBTENCION DE MATRIZ NUCLEAR

1.1 DISCUSION DE LOS METODOS EXPERIMENTALES UTILIZADOS.

1.1.2. REALIZACION DE LAS DIGESTIONES ENZIMATICAS ANTES DE LA EXTRACCION SALINA

El primer método detallado para aislar la matriz nuclear, publicado por Berezney y Coffey (1973) consistía en someter núcleos aislados a una serie de extracciones sucesivas, primero en tampón de baja fuerza iónica, y sucesivamente en tampón de alta fuerza iónica (2M ClNa), detergentes no iónicos y digestiones enzimáticas con DNasa 1 y RNasa A. Su importancia se debe a que fué el primer método que permitió el aislamiento sistemático de matrices nucleares y al hecho de que los procedimientos que fueron desarrollados subsiguientemente derivan de él o al menos están influenciados por él.

La polémica concerniente a la realidad "in situ" de la matriz se inicia a raíz de su publicación, debido a que otros investigadores usando extracciones aparentemente similares es decir, digestiones con nucleasas, extracción en alta fuerza iónica y tratamiento con detergentes no iónicos, aíslan en el mismo sistema celular exclusivamente la fracción lámina-poro (Aaronson y Blobel 1975).

Kauffmann y colaboradores en 1981 señalan que el orden de la secuencia extractiva es la clave que explica la contradicción entre los resultados anteriores (Berezney y Coffey 1974, Aaronson y Blobel 1975). El hecho de realizar las digestiones enzimáticas

antes de la extracción salina, conduce a matrices desprovistas de material interno en hepatocitos. Y proponen la hipótesis de que la extracción en 2M ClNa hace a una cierta proporción (10-15 %) de ARN nuclear altamente resistente a una digestión enzimática posterior; este ARN remanente parece imprescindible en la estabilización del interior de la matriz de este sistema (Kauffman y col.1981).

Sin embargo, la situación es más compleja de lo que Kauffman y col.(1981) plantean en un principio. Los trabajos de He y col.(1990) en células HeLa y MCF-7 corroboran el papel imprescindible del ARN nuclear en la estabilización del interior de la matriz y precisan que se requiere ARN intacto para mantener la integridad de los filamentos básicos matriciales (ARNhn, ARNpre-r y los intermedios de procesamiento 41S, 36S y 32S); pero si se realizan las extracciones aumentando gradualmente la fuerza iónica, desaparecen las estructuras internas después de digestión enzimática con RNasa aunque no se invierta el orden de la secuencia extractiva en estos tipos celulares (He y col. 1990). Parece por tanto, que es el aumento brusco de fuerza iónica el que producía la asociación de proteínas al ARN evitando su digestión. Sin embargo, van Eekelen y col.(1982) realizan en células HeLa las digestiones enzimáticas con DNasa 1 y RNasa A antes de la extracción en alta fuerza iónica (0.4M $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$) y obtienen matriz interna y nucleolar con una asociación de tan sólo el 3.8% del ARN nuclear.

Es posible que estos resultados aparentemente contradictorios se produzcan por solapamiento de diferencias debidas al tipo celular y diferencias debidas al método de extracción que se utiliza. El mismo método, nos referimos a utilizar digestiones previas y extracción en 2M ClNa, aplicado a sistemas celulares distintos, por ejemplo hepatocitos y células HeLa, produce resultados en parte similares, porque la digestión previa afecta a las estructuras internas; y en parte específicos de cada sistema celular,

ya que en células HeLa desaparece solo la matriz nucleolar y en hepatocitos los dos componentes internos (Kauffman y col.1981, Bouvier y col.1982). Métodos distintos, nos referimos a invertir o no los pasos de la secuencia extractiva y ciertas condiciones de extracción en tampón de alta fuerza iónica, aplicados al mismo sistema celular - células HeLa - producen resultados diversos (van Eekelen y col. 1982, He y col. 1990, Bouvier y col.1985).

Nos encontramos ante un dilema. Por una parte la matriz nuclear es muy sensible a los procedimientos que se utilicen para obtenerla, como son el tipo de digestión con RNasa, presencia o ausencia de cationes divalentes, "cross-linking" proteico, condiciones de la extracción en alta fuerza iónica, etc., y además ésta sensibilidad varía según el tipo celular. De forma que cada sistema precisa de un método adecuado, ya que métodos de extracción que resultan útiles en un sistema, fracasan cuando se aplican a otro (Berezney 1984). Para precisar qué diferencias son debidas a características de tipo celular se necesita una solución de compromiso, encontrar un método eficaz para obtener matrices nucleares en un sistema dado homologando al máximo con otros métodos ya ensayados y luego estudiar las variaciones del método que producen resultados aparentemente contradictorios.

1.1.2. INDUCCION DE PUENTES DISULFURO

Aunque los trabajos de Kauffman y col.1981 no desarrollan ningun método nuevo de obtención de matrices nucleares tienen el gran valor de ser un estudio sistemático, en un mismo tipo celular, de los principales factores que estabilizan la matriz interna y la nucleolar en hepatocitos.

Además del ARN nuclear, la formación de puentes disulfuro entre proteínas matriciales próximas, parece otro factor de estabilización de estructuras internas, puesto que el bloqueo irreversible de los grupos sulfidrilo antes del proceso de obtención de la matriz (Kaufmann y col.1981), o la prevención de las oxidaciones fortuitas que puedan ocurrir durante el mismo (Kaufmann y Shaper 1984), conduce a la obtención de matrices nucleares vacías. Los puentes disulfuro parecen ser un factor de estabilización de mayor importancia que el propio ARN ya que después de la oxidación de grupos sulfidrilo ni siquiera el tratamiento con RNasa A antes de la extracción salina, altera la morfología de las matrices interna y nucleolar (Kaufmann y col.1981).

Sin embargo, el papel estabilizador de los puentes disulfuro es un tema controvertido, pues en otros sistemas celulares se obtienen matrices nucleares intactas apesar del bloqueo irreversible de grupos sulfidrilo en células HeLa (van Eekelen y col. 1982), o de la adición de β -mercapto-etanol en concentraciones suficientes para asegurar la reducción de los mismos en todos los tampones de extracción, en células de eritroleucemia de Friend (Long y Ochs 1983), lo que sugiere diferencias de tipo celular en la estabilización del interior de la matriz.

Kaufmann y Shaper (1984) han desarrollado un método interesante para prevenir oxidaciones fortuitas durante el procedimiento de obtención de la matriz, consistente en inducir oxidación reversible de los grupos -SH por medio de TTNa después del aislamiento de núcleos, con el fin de evitar oxidaciones fortuitas y al final del proceso de obtención de la matriz, reducirla reversiblemente con agentes reductores como DTT o β -mercapto-etanol. Este procedimiento conduce en hepatocitos a matrices nucleares vacías. Sin embargo, no es seguro que el efecto destructivo del β -mercapto-etanol o del

DTT se deba exclusivamente a la reducción de los puentes disulfuro ya que podrían estar actuando también como quelantes metálicos (Comerford y col. 1986), según sugieren datos experimentales en núcleos deshistonizados de células HeLa (Lebkowski y Laemmli 1982) y en esqueletos de cromosomas metafásicos que se consideran derivados de una parte de la matriz nuclear (Jeppesen y Morten 1985).

1.1.3. CATIONES DIVALENTES EN LOS TAMPONES DE EXTRACCION

Un tercer factor de estabilización de las estructuras internas de la matriz son los cationes divalentes, los cuales a través de interacciones metalo-proteicas parecen estabilizar las matrices nucleares de modo muy diverso (Comerford y col.1986,Bouvier y col.1985, Lebkowski y Laemmli 1982).

El método desarrollado por Comerford y colaboradores apoya de modo notable esta hipótesis. En su origen, fué diseñado para obtener matrices nucleares en hígado de rata pero puede aplicarse tambien a otros tipos celulares (Comerford y col. 1986). El procedimiento se basa en la inhibición de proteasas de serina con PMSF, la omisión del tratamiento con RNasa y la quelación de los iones Ca^{++} por adición de 1mM EGTA en todos los tampones de extracción. Las matrices obtenidas por este método son delicadas y muy susceptibles a la ruptura durante la sedimentación y la resuspension, pero permite una buena visualización ultraestructural de una malla fibrilar fina que interconecta otra segunda malla formada por fibras gruesas polimórficas. El tratamiento con RNasa antes de la extracción salina rompe las conexiones entre las fibras, pero la matriz interna conserva abundantes fibras individuales separadas, que sólo desaparecen

después de la extracción con alta fuerza iónica. El método confirma que el ARN forma parte de la malla interna matricial. Pero aún omitiendo la digestión con RNasa, el tratamiento con β -mercaptoetanol o con el agente quelante de Cu^{++} 1-10-Fenantrolina solubiliza las fibras intranucleares, y el análisis de la composición polipeptídica de las mismas sugiere que la matriz interior está formada por una malla proteica, constituida principalmente por dos proteínas de 200 y 60KD, unida a otra malla ribonucleoproteica, y ambas estarían estabilizadas parcialmente por puentes disulfuro y parcialmente por interacciones metalo-proteicas en concreto cupro-proteicas (Comerford y col. 1986).

Obviamente la elección de un determinado método de obtención de matriz nuclear o las variaciones que en él se introduzcan dependen del material que se utilice y del enfoque de estudio que se quiera realizar.

En nuestro caso, se había realizado un estudio previo de aislamiento y caracterización ultraestructural de matriz nuclear en células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* (Barthelemy 1984, Barthelemy y Moreno Diaz de la Espina 1984), y estábamos interesados en determinar la composición polipeptídica de la misma, los factores que estabilizan los componentes internos de la matriz y aportar nuevos datos sobre su organización y ultraestructura.

La caracterización se había realizado partiendo de núcleos aislados, para evitar los problemas de penetración de los medios de extracción a través de las paredes celulósicas. De hecho, los métodos de preparación "in situ" de matriz nuclear (Jackson y col.1988, Waitz y Loidl 1988) no son útiles en nuestro caso debido a la pared celular que opone una fuerte barrera a la extracción.

El método elegido para el estudio preliminar había sido el original de Berezney y Coffey (1974) al ser el más extractivo. Además al investigar en sistemas vegetales, material donde prácticamente no existen estudios previos, y teniendo en cuenta que la matriz nuclear sufre notables variaciones estructurales dependiendo del procedimiento experimental usado, preferimos emplear métodos homologables bien ensayados en otros sistemas para continuar el estudio en plantas y determinar qué variaciones estructurales pueden deberse a diferencias de tipo celular.

1.2 ANALISIS ESTRUCTURAL DE LAS MATRICES OBTENIDAS POR LOS DISTINTOS PROCEDIMIENTOS

1.2.1. ULTRAESTRUCTURA DE LAS MATRICES NUCLEARES OBTENIDA REALIZANDO LAS DIGESTIONES ENZIMATICAS ANTES DE LA EXTRACCION SALINA

La matriz nuclear obtenida en estas condiciones está constituida por tres componentes morfológicos: complejo lámina-poros, matriz interna y matriz nucleolar, que no difieren significativamente de los obtenidos realizando las digestiones enzimáticas después de la extracción salina (Moreno Díaz de la Espina y col.1990a). Esto indica que la matriz interna en *Allium cepa* es estable frente a procedimientos que resultan drásticos en otros sistemas, y no parece estar estabilizada por un ARN como las matrices de hepatocitos y células HeLa (Bouvier y col.1985, Kauffman y col.1981).

ORGANIZACION DE LA LAMINA

Hemos identificado una lámina estructuralmente bien desarrollada y con poros complejos asociados, homóloga desde un punto de vista estructural a la de células animales (Krohne y Benavente 1986).

La lámina de invertebrados y vertebrados es una capa fibrosa de material proteico (Bouteille y col. 1983, Agutter y Richardson 1980) formada por fibras de 10 nm de diámetro interconectadas con los poros complejos (Aebi y col. 1986). Su grosor (10-300 nm) y organización estructural varían en los distintos núcleos eucarióticos (Bouteille y col. 1983). La lámina más frecuente tiene un grosor aproximado de 10 nm, aunque algunas láminas de Protozoos, células mesenquimáticas y neuronas del orden Hirudo son inusualmente gruesas (hasta 300 nm), presentan una organización estructural característica en cada caso, y pueden estar formadas por la polimerización en capas de filamentos de laminas (Aebi y col. 1986). La lámina de células meristemáticas de *Allium cepa* se observa en secciones tanto tangenciales como transversales como una malla formada por fibras de aproximadamente 10 nm de diámetro y con independencia de diferencias o no en su composición química, estructuralmente es homóloga a la más frecuentemente encontrada en sistemas animales (Aebi y col. 1986).

Su identificación en *Allium cepa* está de acuerdo con los datos preliminares de Barthelemy (1984) y Stolyarov (1984) y Moreno Diaz de la Espina y col. (1990a) utilizando el procedimiento de extracción de Berezney y Coffey (1974), y en contraste con los de Ghosh y Dey (1986) quienes no detectan lámina en estas mismas células, probablemente debido a daños sufridos por sus matrices durante la preparación o a una deficiente fijación de las fracciones. Nuestros datos demuestran que la organización de

la lámina es independiente de la presencia de un ARN estructural y depende de interacciones proteína-proteína, probablemente por polimerización entre laminas de forma análoga a la descrita en vertebrados, ya que muy recientemente se ha detectado una lamina en este sistema (Moreno Diaz de la Espina y col. 1990 b).

ORGANIZACION DE LA MATRIZ INTERNA

En estas preparaciones y de forma más patente que en las matrices obtenidas por el procedimiento de Berezney y Coffey se demuestra la existencia de dos mallas de diferente organización estructural y contraste a los electrones en la matriz interna. Una de ellas presenta asociados gránulos de 25-30 nm. Esta organización es análoga a la observada en células animales (hepatocitos, eritrocitos de pato, células HeLa, células de eritroleucemia de Friend) (Berezney y Coffey 1974, Maundrell y col.1981, Bouvier y col.1984, Long y col.1979). Sus fibras coinciden en grosor (5nm) y densidad electrónica con las fibras finas de bajo contraste a los electrones que en esos sistemas se consideran las fibras matriciales básicas (Berezney 1984, Long y col.1979). En células HeLa S3 (Gallinaro y col.1983), se ha observado en la matriz interna una sólo malla electron-densa formada por complejos de RNPhn y RNPsn resistentes a sal. Sin embargo, este tipo de matrices se obtienen omitiendo la digestión con RNasa y extrayendo en fuerza iónica menor (0.4M ClK), por lo cual tienen asociado la mayor parte del ARNhn y no se puede descartar la posibilidad de que la abundante malla electron-densa que se observa, oculte otra fibrilar fina subyacente. Esta posibilidad cobra cuerpo teniendo en cuenta la evidencia experimental de He y col.(1990), quienes también en células HeLa, observan después de extracción en $0.25\text{M SO}_4(\text{NH}_4)_2$, es decir fuerza iónica suave, una malla compleja formada por fibras gruesas polimórficas que oculta otra fibrilar fina subyacente sólo revelada después de extracción con 2M ClNa ,

pero siempre que la elevación de la fuerza iónica de los tampones se haga de forma gradual.

Los elementos internos de la matriz nuclear de *Allium cepa*, son muy poco abundantes en condiciones que permiten la actividad de RNasa endógena, por supresión del inhibidor de ribonucleasas DPC en el medio "standard" de aislamiento de núcleos (Wolf y col.1970). Esta evidencia circunstancial sugiere que puede contener algún tipo de ARN, altamente protegido de la digestión exógena pero accesible a nucleasas endógenas, que podría ser un factor estabilizante de la matriz interna.

Frente a procedimientos extractivos similares la matriz interna presenta un comportamiento diferencial dependiendo de la especie. Desaparece en hepatocitos (Kaufmann y col.1981) o se preserva en forma de fibras arrosariadas como en células HeLa (Bouvier y col.1982,1985), mientras que en *Allium cepa* muestra una estabilidad parcial.

Esta variabilidad de comportamiento sugiere diferencias en la composición química de la matriz interna dependiendo del tipo celular, que se confirman analizando los perfiles polipeptídicos de las matrices nucleares en diferentes sistemas celulares (Berezney 1984, Herland y Wunderlich 1976, Mitchelson y col. 1979).

Los gránulos de la matriz interna de *Allium cepa* son similares ultraestructuralmente a los de células animales (Berezney 1984, Kryzowska-Gruca y col. 1983). De los dos tipos de gránulos observados en las regiones intercromatínicas de los núcleos "in situ" (Medina y col.1989) o aislados, los de 25-30 nm son los únicos que resisten la extracción en alta fuerza iónica. Por su tamaño, localización, distribución topológica y contrastación

selectiva con EDTA y oxinitrato de Bismuto, como veremos en el apartado siguiente, son idénticos a los previamente descritos como G.I. en células vegetales (Medina y col.1989).

"In situ" los G.I. se asocian a fibrillas finas formando pequeñas agrupaciones de gránulos distribuidos regularmente a lo largo de las regiones intercromatínicas (Medina y col.1989), a diferencia de la distribución que presentan en células animales (Monneron y Bernhard 1969, Puvion y Bernhard 1975), y nuestros datos demuestran que ésta distribución característica es mantenida en la matriz interna. Las fibrillas matriciales podrían corresponder por su ultraestructura y localización a las fibrillas de asociación de estos gránulos localizadas ultraestructuralmente en el núcleo "in situ" (Medina y col. 1989).

Los G.I. son estructuras cuyas funciones en el metabolismo nuclear no están claramente definidas. Se han detectado en ellos ARNs de pequeño tamaño de la serie U (Fakan y col. 1984, Puvion y col.1984) y parecen ser lugares de transferencia y / o acumulación de precursores ribosómicos inmaduros cuando se bloquea la síntesis de ARNr con antimetabolitos (Puvion y col. 1984). También contienen proteínas nucleolares relacionadas con la subunidad grande del ribosoma (Hügler y col.1985). Independientemente de que su función metabólica sea mejor conocida en un futuro, su asociación a la matriz tanto en sistemas animales como vegetales indica que no sólo existe similitud morfológica entre ambos tipos de matrices, sino que probablemente estén implicadas en el mismo tipo de funciones en el metabolismo nuclear.

ORGANIZACION DE LA MATRIZ NUCLEOLAR

La matriz nucleolar de *Allium cepa* muestra una ultraestructura exclusivamente fibrilar, las partículas preribosómicas no resisten la extracción y no son por tanto componentes del nucleolo residual. Esta es una característica común de todas las matrices nucleolares estudiadas hasta ahora (Bouteille y col. 1983, Berezney 1984, Verheijen 1988). En ella se distinguen centros fibrilares residuales muy similares a los observados en el nucleolo "in situ". En sistemas animales, el mantenimiento de centros fibrilares en la matriz nucleolar es un tema controvertido que parece depender del tipo celular (Berezney 1984, Bouteille y col. 1983). En hepatocitos, se obtienen matrices nucleolares con centros fibrilares morfológicamente diferenciados (Berezney 1984), mientras que en células HeLa muestra una estructura fibrilar homogénea sin centros fibrilares aparentes (Bouteille 1983). Por este motivo no se puede sostener que los centros fibrilares sean la contrapartida "in situ" de la matriz nucleolar. En *Allium cepa* sin embargo, constituyen el componente residual del nucleolo más fácilmente observable "in situ".

La matriz nucleolar aparece muy extraída en las matrices nucleares obtenidas en condiciones que permiten actividad de RNasa endógena. Esto sugiere que podría estar estabilizada en parte, por algún tipo de ARN altamente resistente a la digestión exógena, pero no muestra un comportamiento diferente del de la matriz interna, como sucede en otros sistemas (Bouvier y col.1985, Bourgeois y col.1987). En células HeLa, la matriz nucleolar desaparece cuando se realizan las digestiones enzimáticas en presencia de Mg^{++} antes de la extracción salina (2M ClNa) mientras que la matriz interna se preserva (Bouvier y col.1985). En fibrocitos, sin embargo, sucede lo contrario, en condiciones similares la matriz nucleolar es la única estructura interna que se observa presentando una morfología de malla fibrilar homogénea muy semejante a la de *Allium cepa* (Bourgeois y col.1987). Es importante resaltar que el método de extracción

empleado, es decir, condiciones de digestión enzimática y extracción en tampón de alta fuerza iónica, es similar en células HeLa, fibrocitos y *Allium cepa* por lo que las diferencias de comportamiento de la matriz interna con respecto a la nucleolar observadas en esos tres sistemas celulares pueden atribuirse a diferencias de tipo celular.

Las matrices nucleares obtenidas a partir de distintos sistemas celulares no sólo son diferencialmente sensibles a su estabilización por ARN, sino también a las condiciones de extracción en tampón de alta fuerza iónica.

Las células HeLa, parecen ser el sistema más sensible a condiciones de extracción en alta fuerza iónica (2M ClNa). Las matrices obtenidas por Bouvier y col.(1984) omitiendo la digestión con RNasa y aplicando directamente extracción en 2M ClNa poseen matrices nucleolares, formando agregados densos, entremezclados con regiones de matriz interna. Mientras que van Eekelen y col.(1982) empleando extracción en fuerza iónica menor (0.4M $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$) obtienen matrices bien preservadas. Los datos de He y colaboradores (1990) indican que la aplicación directa de 2M ClNa después de digestión con DNasa 1 produce agregación de los elementos de la matriz sobre los filamentos básicos que forman el nucleoesqueleto. Sin embargo, estas condiciones son necesarias en dicho sistema para revelar la malla matricial de filamentos básicos, que subyace oculta por el componente matricial polimórfico cuando se emplean extracciones en tampón de fuerza iónica menor. Los filamentos básicos formados por fibras de 10 nm sólo son revelados cuando se aumenta gradualmente la extracción en alta fuerza iónica.

Sin embargo la aplicación directa de 2M ClNa en *Allium cepa*, no desorganiza notablemente, la matriz interna ni la nucleolar. En el caso de la matriz interna, su

organización queda establecida en la extracción con tampón de baja fuerza iónica y en el caso de la matriz nucleolar, la extracción en 2M ClNa produce una elevada extracción de este componente que no altera la morfología de los centros fibrilares residuales.

En resumen, la ultraestructura de la matriz nuclear de *Allium cepa* es homologable a la que se obtiene en determinados sistemas celulares a partir del mismo procedimiento (Berezney 1984) pero presenta una mayor estabilidad frente a la de otras especies (Kaufmann y col. 1981, 1984, Bouvier y col. 1984). Algún tipo de ARN de difícil digestión para las nucleasas exógenas, podría ser responsable de la estabilización de sus elementos internos, pero estas estructuras conservan una morfología bien definida, y una distribución topológica característica, independientemente de que se realicen digestiones exhaustivas exógenas de ARN antes o después de la extracción salina, y aun permitiendo la acción de nucleasas endógenas antes de los procedimientos extractivos.

1.2.2. ULTRAESTRUCTURA DE LAS MATRICES NUCLEARES OBTENIDA POR TRATAMIENTO CON TTNa Y DTT

La estructura interna de la matriz nuclear no se altera notablemente cuando se mantiene la oxidación de los grupos sulfidrilo de sus proteínas durante el procedimiento de extracción, pero presenta evidentemente mayor abundancia de elementos internos. Esto, unido al aumento en las proteínas matriciales que se recuperan en la fracción correspondiente, sugiere que debe existir un núcleo proteico mínimo, responsable de la organización de las estructuras internas, al cual se asocian las nuevas proteínas matriciales que aparecen en el perfil polipeptídico. Al revertir la oxidación de éstos grupos por reducción con DTT, estas proteínas serían liberadas y obtendríamos el

conjunto de proteínas y estructuras correspondientes a la matriz nuclear obtenida en condiciones de alta fuerza iónica.

La lámina no se altera en su estructura después de la oxidación de grupos sulfidrilo, ya que está constituida por un polímero de laminas que forman una red ortogonal muy estable que no depende de ellos para su estabilización (Aebi y col. 1986, Kauffman y col. 1981); y es el único componente matricial no sujeto a polémica en la controversia sobre el papel de los puentes disulfuro en la estabilización de estructuras matriciales (Kaufmann y col. 1981, van Eekelen y col. 1982). La lámina de *Allium cepa* se comporta como la del resto de vertebrados y esto nos lleva a pensar que las laminas son las únicas proteínas tipo F.I. de plantas que son capaces de polimerizar en un esqueleto, en contraposición con las proteínas tipo F.I. del citoplasma, que en plantas no polimerizan en un citoesqueleto organizado, sino que se asocian al esqueleto de microtúbulos (Powell y col. 1982, Hargreaves y col. 1989).

La matriz interna y la nucleolar muestran un comportamiento diferencial en su ultraestructura. El nucleolo es el componente matricial que más se afecta al sufrir una gran compactación de su estructura. Esto sugiere diferencias en la composición polipeptídica y tipo de interacciones entre proteínas de ambas, que han sido documentadas experimentalmente en algunos sistemas (Todorov y Hadjiolov 1979, Olson y col 1986).

En condiciones reducidas se recupera la ultraestructura típica de la matriz nuclear obtenida por otros procedimientos en este sistema, sugiriendo que o bien no se producen oxidaciones fortuitas significativas durante los procedimientos de extracción, o bien que éstas no producen cambios detectables a nivel ultraestructural. Sólo a veces

se observa en las matrices reducidas una relajación de parte de la malla más densa a los electrones, quedando patentes las fibras arrosariadas que la componen. Esta malla a juzgar por sus variaciones estructurales es quizá el elemento más sensible a la formación fortuita de puentes disulfuro en la matriz interna.

En resumen, la inducción de puentes disulfuro en la matriz nuclear conlleva un aumento de los elementos estructurales internos que se recuperan al final de la extracción, aunque la morfología general de la matriz no se altera, distinguiéndose los dos tipos de mallas y los gránulos de 25-30 nm, característicos de las matrices obtenidas por los procedimientos I y II. La matriz nucleolar es el componente más afectado por la oxidación. La reducción de puentes disulfuro produce la recuperación de la ultraestructura típica de la matriz nucleolar y permite la visualización individualizada de las fibras de la matriz interna. Estos datos sugieren la existencia de un grupo mínimo de proteínas responsable de la organización de las estructuras internas.

Nuestros datos demuestran la existencia de una estructura residual interna en núcleos vegetales, resistente a los diferentes procedimientos de extracción utilizados. Independientemente del método empleado para su obtención, las matrices nucleares muestran una organización estructural análoga a nivel de M.E. con lámina, matriz nucleolar y elementos internos. Este modelo de organización es similar al encontrado en otros tipos celulares (Berezney 1984, Verheijen y col. 1988). Los componentes del interior de la matriz sufren ciertas variaciones estructurales dependiendo del procedimiento experimental usado, pero presentan una identidad definida frente a cada variación del método y su organización es similar a la encontrada en otros eucariotas (Berezney 1984, Verheijen y col. 1988). La lámina es el componente más estable al consistir en un polímero de proteínas tipo F.I. muy estable (Aebi y col. 1986) que no son

sensibles a las variaciones del procedimiento de extracción utilizadas.

1.2.3. CATIONES DIVALENTES EN LOS TAMPONES DE EXTRACCION

En *Allium cepa*, la supresión de iones Mg^{++} en todos los tampones de extracción conduce a la ruptura de la matriz nuclear. En otros sistemas celulares, los cationes divalentes también estabilizan múltiples aspectos de la matriz nuclear.

Son imprescindibles en células HeLa para mantener niveles de plegamiento de ADN sobre estructuras proteicas del interior de la matriz (Lebkowski y Laemmli 1982, Lewis y Laemmli 1982) y para que los complejos de RNP resistentes a sal formen una malla interna (Bouvier y col.1985), y para recuperar matrices nucleolares con una estructura diferenciada en células de eritroleucemia de Friend (Long y Ochs 1983). Pero las condiciones en las que se ha analizado su papel son muy diversas, adición de quelantes metálicos en el tampón de alta salinidad (Lebkowski y Laemmli 1982, Lewis y Laemmli 1982), digestiones enzimáticas en baja concentración de Mg^{++} (Bouvier y col.1982) o extracción de cromatina y proteínas solubles en 2mM EDTA (Long y Ochs 1983), y no son directamente homologables con las nuestras.

Sin embargo, el método desarrollado por Comerford y col. (1986) suprime los iones Ca^{++} en todos los tampones de extracción y es quizás la aproximación experimental que mejor se homologa. Estas matrices son frágiles y sensibles a la ruptura durante la manipulación, y probablemente suceda lo mismo en *Allium cepa*.

Se desconoce el mecanismo preciso por el cual los cationes divalentes estabilizan la matriz nuclear, pero así como la matriz de *Allium cepa* presenta diferencias respecto

de otros sistemas celulares en su sensibilidad frente al ARN nuclear y los puentes disulfuro, su estabilización por medio de cationes divalentes parece una característica general en sistemas animales y vegetales.

1.3 COMPOSICION POLIPEPTIDICA DE LA MATRIZ NUCLEAR

1.3.1. EFECTO DE LA INVERSION DE LA SECUENCIA EXTRACTIVA SOBRE LA COMPOSICION POLIPEPTIDICA DE LA MATRIZ NUCLEAR

Las digestiones enzimáticas, efectuadas antes o después de la extracción salina, no modifican de modo notable los perfiles polipeptídicos obtenidos. Las matrices presentan en ambos casos un perfil muy extraído comparado con el de los núcleos aislados y están enriquecidas en proteínas del rango de 63-50 KD, otra de 37 KD y proteínas de bajo Pm. Las matrices obtenidas por el método de Berezney y Coffey presentan una banda adicional mayoritaria a 27 KD y las obtenidas realizando las digestiones enzimáticas antes de la extracción salina una banda a 71 KD.

Las matrices obtenidas en condiciones que permiten actividad de RNasa endógena presentan como únicas bandas aparentes las del rango de 63-50 KD. Tomados en conjunto, estos datos sugieren que la proteína de 37 KD cuyo Pm coincide con el de las proteínas del grupo B de las monopartículas del ARNhn (Peters y Comings 1980) podría estar estabilizada en su unión a la matriz por algún tipo de ARN nuclear de difícil digestión exógena, y las proteínas de 63-50 KD que son comunes en las matrices obtenidas a partir de cualquier procedimiento y permanecen incluso después de permitir la acción de RNasa endógena parecen estar estabilizadas por interacciones proteína-proteína.

1.3.2. COMPOSICION POLIPEPTIDICA DE LAS MATRICES NUCLEARES OBTENIDAS POR TRATAMIENTO TTNa-DTT

El agente oxidante TTNa produce la retención de proteínas específicamente unidas

a la matriz interna (Kaufmann y Shaper 1984), entre ellas algunas de Pm superior a 80 KD (Berezney 1984). Nuestros resultados indican que las matrices tratadas con TTNa contienen proteínas de alto Pm y presentan mayor complejidad polipeptídica que las obtenidas por cualquier otro procedimiento de extracción. A pesar de que estas matrices presentan abundantes bandas, su perfil difiere del de los núcleos aislados por el enriquecimiento de las bandas matriciales de 70, 50 y 37 KD, y la falta de las bandas típicas de histonas. Su mayor contenido en material interno, igual que sucede en otros sistemas (Berezney 1984), sugiere una localización preferente en el interior de la matriz de las proteínas asociadas por "cross-linking".

Estas matrices, después de reducidas con DTT, recuperan un perfil polipeptídico similar al obtenido por los procedimientos I y II, aunque presentan componentes de mayor Pm. Las proteínas del rango 63-50 KD y 37 KD son predominantes, y se solubilizan en gran parte las proteínas asociadas a las matrices por el tratamiento con TTNa. Este hecho confirma a las proteínas de 63-50 KD y la de 37 KD que aparecen en los perfiles de las extracciones I y II, como proteínas matriciales básicas de *Allium cepa*. La disminución de bandas en estas matrices se correlaciona con una disminución en el contenido de elementos internos observado al M.E., lo que apoya la hipótesis de una localización preferentemente interna de las proteínas asociadas por "cross-linking".

Aunque las matrices reducidas con DTT presentan un perfil polipeptídico semejante al de los procedimientos I y II, conservan algunas bandas presentes en las matrices tratadas con TTNa. Estas bandas podrían interpretarse como el resultado de un "cross-linking" mantenido en presencia de DTT, pero esto no parece probable dadas

las condiciones en que se ha efectuado la reducción, y corresponderían por tanto a componentes comunes de ambas matrices. Las diferencias proteínicas entre ambas matrices y las obtenidas por los procedimientos I y II se deben probablemente a que las extracciones en los dos últimos casos fueron mucho más drásticas. Estas bandas polipeptídicas obviamente no son imprescindibles para el mantenimiento de las matrices interna y nucleolar en *Allium cepa*, puesto que las matrices obtenidas por los procedimientos I y II no las presentan y contienen claramente estructuras internas. La posibilidad de que las proteínas del rango 63-50 KD comunes a todas las matrices, estuvieran mantenidas por puentes disulfuro es despreciable, ya que se enriquecen específicamente en las matrices reducidas con DTT. Si estas proteínas estuvieran mantenidas por puentes disulfuro, se habría producido una reducción selectiva del "cross-linking" que sólo podría explicarse si las proteínas del rango 63-50 KD formaran un núcleo proteico recubierto y protegido de la reducción por proteínas asociadas.

1.3.3. COMPONENTES POLIPEPTIDICOS DE LA MATRIZ NUCLEAR

Las dotaciones polipeptídicas de las matrices obtenidas por los 4 procedimientos experimentales son complejas, revelan abundantes bandas entre 120 y 17 KD y varían de acuerdo con el procedimiento de extracción utilizado. El procedimiento de Berezney y Coffey (1974) y la realización de digestiones enzimáticas previas a la extracción salina siguiendo el mismo método, son los procedimientos más extractivos. Cualquiera que sea el procedimiento utilizado, aparecen las bandas de 63, 54 y 50 KD como componentes constantes de las matrices. Estas bandas no son mayoritarias en los núcleos aunque están presentes en ellos y van enriqueciéndose en las fracciones residuales a lo largo de las sucesivas extracciones. Son las únicas que se observan en las matrices nucleares que tienen la organización estructural más sencilla, obtenidas permitiendo la digestión por

nucleasas endógenas, y constituirían el grupo de proteínas estructurales básicas de la matriz de *Allium cepa*.

Probablemente estas bandas corresponden a más de tres polipéptidos pero para su separación habría que recurrir a geles bidimensionales con doble separación por P_m y punto isoelectrico.

Estos datos sugieren que unos pocos polipéptidos mantendrían la estructura básica altamente ordenada de la matriz nuclear, cuya composición polipeptídica total es dependiente de las condiciones de extracción. Los indicios de que la matriz pueda formarse al menos en parte como resultado de la agregación proteica durante la extracción, se basan en buena medida en la variabilidad del modelo polipéptidico de la matriz nuclear cuando se varía el procedimiento de extracción. Los resultados obtenidos en los perfiles polipeptídicos de las diferentes matrices, correlacionados con la ultraestructura de las mismas, no apoyan la idea de una agregación proteica caótica, sino la existencia de un grupo de proteínas mínimo que organiza la matriz, al cual se asocian, dependiendo del protocolo experimental usado, distintas proteínas nucleares próximas.

Nuestros resultados estan de acuerdo con los de Stolyarov (1984), quien obtiene un perfil polipeptídico complejo en *Allium cepa*, con proteínas matriciales entre 140 y 12 KD, agrupadas principalmente en los rangos 70-50 KD y 40-30 KD con bandas débiles en el rango 140-120 KD, propio de matrices sometidas a un proceso extractivo suave. El escaso número de bandas descrito por Gosh y Dey (1986) en este mismo material puede deberse bien a diferencias en el procedimiento de extracción por no usar inhibidores de proteasas ni de nucleasas endógenas, o bien a las diferencias de

material, pues aunque se trate de la misma especie su estudio está realizado sobre todos los tejidos del bulbo, incluyendo varios tipos celulares distintos, y es conocido que la composición y organización de la matriz nuclear varía en distintos tejidos de la misma especie (Aligué y col. 1990, Lafond y Woodcock 1983, Milavetz y Edwards 1986, Woodcock y Woodcock 1986, Stewart y Burke 1987, Lourim y Lim 1990, Benavente y col.1985).

Los componentes proteicos de la matriz de *Allium cepa*, presentan pesos moleculares menores de los obtenidos en matrices nucleares de vertebrados (mamíferos y aves) cuyas proteínas principales se detectan en el rango 75-45 KD (Shaper y Coffey 1977, Peters y Comings 1980, Maundrell y col.1981). También difiere en parte del obtenido en matrices nucleares de eucariotas inferiores, cuyas proteínas principales se detectan entre 14-28 KD (*Tetrahymena Piriformis*) y 23-36 KD (*Physarum Polycephalum*) (Herland y Wunderlich 1976, Herland y col.1976, Mitchelson y col.1979). Presenta, sin embargo, una similitud muy notable con el de levaduras (*Saccaromyces cerevisiae*), cuya matriz nuclear contiene 3 bandas en el rango 60-55 KD y bandas individuales a 36, 29 y 14 KD (Pothaskin y col. 1984). La semejanza del perfil polipeptídico entre *Allium cepa* y levaduras sugiere relaciones estrechas entre la matriz de los dos sistemas, confirmada por la detección de laminas en ambos (Moreno Diaz de la Espina y col.1990b, Georgatos y col.1989).

Parece por tanto que la matriz nuclear sería una característica ancestral del núcleo eucariota, y que la matriz de plantas estaría más próxima a la de eucariotas primitivos que a la de vertebrados, mucho más distantes evolutivamente.

En *Allium cepa* no sólo existe una lámina bien organizada estructuralmente, sino

también homologable a la descrita en vertebrados. En efecto se ha detectado una proteína de 71 KD, como componente constante pero no mayoritario de las matrices, que es reconocida por un anticuerpo antilamina C en "blots" de proteínas de matrices nucleares y núcleos (Moreno Díaz de la Espina y col. 1990b). Esta proteína está localizada en la lámina de las matrices y la envuelta nuclear de núcleos aislados (Moreno Díaz de la Espina y col. 1990b) y constituye la primera proteína perteneciente a la familia de los filamentos intermedios descrita en plantas, que no tienen un citoesqueleto organizado de F.I. como ocurre en vertebrados (Lloyd y col. 1987, Hargreaves y col. 1989).

Las proteínas de bajo Pm (15-19 KD) son componentes constantes de las matrices obtenidas en todos los procedimientos utilizados por nosotros, y han sido también detectadas por Stolyarov (1984). Sus Pms coinciden aproximadamente con los de las histonas del "core" nucleosomal de plantas (Spiker 1985). Sin embargo, la baja proporción de ADN existente en estas matrices según los datos de fluorescencia con DAPI y el inmunomarcado del ADN matricial, están en contradicción con la existencia de cantidades tan altas de histonas. Aunque los datos de reasociación inespecífica de histonas exógenas con la matriz nuclear son contradictorios (ver Berezney 1984, Grebanier y Pogo 1979), experimentos recientes de nuestro laboratorio han demostrado que un anticuerpo dirigido contra la histona H4 que es la más conservada, reconoce a la proteína en los núcleos de *Allium cepa* pero no en las matrices (Moreno Díaz de la Espina y col. 1990b). Queda abierta la posibilidad de que en su mayor parte fueran productos de degradación proteolítica puesto que la tinción que se observa en esa zona es difusa pero al trabajar a 4°C y utilizar inhibidores de proteasas no parece probable. También podrían corresponder a proteínas no histónicas de bajo Pm que son componentes típicos de eucariotas inferiores (*Tetrahymena Piriformis*) (Herland y

Wunderlich 1976).

Respecto a los otros componentes proteicos de las matrices de plantas poco podemos precisar actualmente, excepto que existen proteínas en el mismo rango de Pm que las principales proteínas matriciales descritas en otros sistemas como son las proteínas que se asocian al ADN (Razin y col. 1981, Noaillac-Depeyre y col. 1987, Bodnar y col.1983) y al ARN (Poznanovic y Sevaljevic 1986, Smith y col. 1986, Peters y Comings 1980).

2. ACIDOS NUCLEICOS EN LA MATRIZ NUCLEAR

2.1 DISCUSION DE LOS METODOS UTILIZADOS EN LA DETECCION DE LOS ACIDOS NUCLEICOS

FLUORESCENCIA:DAPI-PIRONINA

Las técnicas de fluorescencia, permiten la detección "in situ" de determinados componentes en estructuras celulares. Son procedimientos rápidos y ampliamente utilizados como preliminares de otras técnicas más laboriosas como microscopía electrónica; o como control por la facilidad de visualización e identificación de moléculas específicas cuando se unen con fluorocromos (Sgorbati y col. 1986, Crissman y Stinkamp 1973, Crissman y Tobey 1974).

Respecto al marcaje de ácidos nucleicos, existen varios fluorocromos específicos para ADN (DAPI, DIPI, HOECHST 33258, HOECHST 33342) y varios que se unen tanto a ADN como a ARN (naranja de acridina, pironina, bromuro de etidio) pero ninguno específico de ARN. Por tanto, la única alternativa para marcar ARN consiste en incubar la muestra primero con una sustancia o fluorocromo específica de ADN y una vez bloqueados los lugares de unión al ADN, incubar con un fluorocromo de los que pueden detectar a ambos. La utilización de un fluorocromo de unión a ADN para el bloqueo permite detectar simultáneamente ambos ácidos nucleicos al observar la muestra con los respectivos filtros específicos.

El DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol) es conocido por su tinción específica de ADN por unión intercalante, preferencial de regiones ricas en A-T (Sgorbati y col.1986). Lo hemos preferido a otros fluorocromos específicos de ADN, por las ventajas de su decaimiento relativamente lento, su ruido de fondo excepcionalmente bajo y por la intensidad y especificidad del complejo fluorescente DAPI-ADN (Sgorbati y col. 1986). Además la tinción con DAPI había sido ya utilizada con éxito para detección de ADN en matrices nucleares de levaduras habiéndose determinado la cantidad de ADN máximo por debajo del umbral de fluorescencia (Potashkin y col.1984).

La PIRONINA Y, es un fluorocromo básico del grupo de los xantenos, conocido por su reacción con ácidos nucleicos de cadena doble y sencilla (Scott 1967) pero que sólo fluoresce cuando se intercala en regiones de doble cadena (Tráganos y col. 1988). Se ha seleccionado en lugar de otros fluorocromos que detectan ADN-ARN por ser el que presenta mayor unión preferencial por ARN cuando se usa en combinación con otra sustancia o fluorocromo que bloquee previamente los posibles lugares de unión ADN-PIRONINA (Pollack y col. 1982), e incluso en ausencia de fluorocromo de unión a ADN (Darzinkiewicz y col. 1987); por la sensibilidad para detectar niveles muy bajos de ARN, ya que es capaz de marcar ARN mitocondrial (Cowden y Curtis 1983) y para evitar excesivo ruido de fondo como ocurre con el naranja de acridina.

El método de fluorescencia DAPI-PIRONINA en las condiciones que hemos puesto a punto en este sistema celular es rápido y fiable, las fracciones nucleares no muestran autofluorescencia ni se detecta ruido de fondo que puede interferir con la localización de ADN y ARN en las estructuras nucleares.

INMUNOCITOQUIMICA: LOCALIZACION DE ADN

La finalidad de las técnicas de inmunomarcado, es localizar un componente de interés, utilizando un anticuerpo producido contra un determinante antigénico de ese componente. Las técnicas de preparación de la muestra principalmente la fijación e inclusión, son muy importantes para conseguir por una parte un marcado óptimo, y al mismo tiempo poder localizar con precisión la estructura donde el componente de interés se encuentra.

La obtención de una buena preservación estructural para inmunomarcado, significa conseguir una conservación adecuada de la estructura y, a la vez, una buena retención de las características químicas y antigénicas. Sin embargo, son dos propiedades generalmente alternativas y la puesta a punto de la técnica en un determinado material implica conseguir un equilibrio entre ambas. El glutaraldehído, produce una buena preservación estructural; pero, por lo general, dificulta la penetración de los reactivos y puede enmascarar epitopos al producir "cross-linking" con proteínas próximas. Por ello se usa preferentemente paraformaldehído al 4% o mezclas de ambos fijadores (Tokuyasu 1984). Otros fijadores preservan bien la antigenicidad pero no conservan las características estructurales tan eficazmente como los fijadores aldehídicos (Stirling 1990).

Para la realización de reacciones inmunocitoquímicas en corte es necesario el uso de resinas acrílicas con carácter hidrofílico y polar. Entre ellas hemos seleccionado el LR White por su baja toxicidad, sencillo manejo, por no necesitar polimerización a muy bajas temperaturas que requiere un aparataje costoso, y principalmente porque al ser hidrófila permite que las soluciones de los anticuerpos impregnen homogéneamente la superficie del corte (Newman 1987, Newman y Hobot 1987, Stirling 1990). Para la

detección del anticuerpo primario se ha elegido un anticuerpo secundario conjugado con oro, frente a otros tipos de marcado como la peroxidasa, por su mayor facilidad de visualización al microscopio electrónico, porque no requiere reacciones enzimáticas posteriores, y localiza al epitopo con partículas de pequeño tamaño lo que permite una gran precisión en la adscripción del marcado, fácilmente distinguible de las estructuras biológicas.

El anticuerpo utilizado para el marcado del ADN ha demostrado ser altamente específico en *Allium cepa*, ya que la adsorción del anticuerpo con ADN purificado antes de la incubación elimina totalmente el marcado "in situ" (Martín y col.1989), y produce el mismo modelo de marcado en el núcleo aislado que "in situ".

Esta técnica al ser más sensible que la fluorescencia nos ha permitido localizar el dominio de cromatina de la matriz nuclear.

TINCION REGRESIVA DE EDTA

La tinción regresiva de EDTA desarrollada por Bernhard (1969) es universalmente utilizada para tinción preferencial de ribonucleoproteínas a nivel de microscopía electrónica. Está basada en la observación de que los iones uranilo unidos a deoxiribonucleoproteínas son más fácilmente eliminados por un agente quelante que los unidos a ribonucleoproteínas, y se efectúa sobre material fijado en aldehído. El método de tinción regresiva de EDTA produce, por tanto, un blanqueamiento de la cromatina y un contraste preferencial de las estructuras que contienen ARN.

En esta técnica, los tiempos de exposición de la muestra a la tinción con acetato

de uranilo y al blanqueamiento posterior con EDTA son críticos para obtener una tinción específica y dependen principalmente del material que se estudie y del tipo de resina en el que esté infiltrado (Moyne 1982). La duración de la exposición al uranilo depende del tipo de resina, en general, las acrílicas necesitan tiempos más cortos que las hidrófobas (Moyne 1982). La duración de la exposición al EDTA depende de dos factores, el material de estudio y el tipo de resina en el que está infiltrado, los tejidos de mamífero son los que necesitan tiempos de incubación más cortos y los de los vegetales los más largos (Moreno Diaz de la Espina y Risueño 1977, Moreno Diaz de la Espina y col. 1978, Moreno Diaz de la Espina y col. 1982), y un mismo tejido si está incluido en resina acrílica necesitará menos tiempo de incubación con EDTA que si lo está en resina hidrófoba (Moyne 1982).

La determinación precisa del tiempo de tinción con uranilo y del blanqueamiento con EDTA a utilizar, se hizo empíricamente tomando como referencia estudios previos en células enteras incluidas en resinas epoxy (Moreno Diaz de la Espina y Risueño 1977, Moreno Diaz de la Espina y col. 1978, Moreno Diaz de la Espina y col. 1982) y utilizando núcleos aislados incluidos en resinas acrílicas, en los cuales las estructuras deoxiribonucleoproteicas estan perfectamente localizadas.

La dependencia de la reacción de los factores de penetración queda en nuestro caso minimizada al utilizar resinas acrílicas (Pearson y Davies 1982, Monneron y Bernhard 1969).

Se ha argumentado que en ciertos casos estructuras no ribonucleoproteicas como las proteínas fosforiladas pueden retener preferencialmente el uranilo como ocurre con el ARN (Pearson y Davies 1982, Wassef 1979), sin embargo en nuestro caso esto no

parece probable pues los métodos de detección citoquímica de ARN y proteínas fosforiladas detectan diferentes estructuras tanto "in situ" (Medina y col. 1989) como en el núcleo aislado y matriz nuclear.

Aunque la tinción con EDTA está sujeta a resultados ambiguos si no se controlan todos los factores que la regulan, es por el momento la única tinción citoquímica disponible para detección de ARN al M.E. y ha servido en buena medida para localizar y caracterizar las estructuras de ARN nucleares (Monneron y Bernhard 1969, Pearson y Davies 1982).

2.2 ADN Y DOMINIOS DE CROMATINA EN LA MATRIZ NUCLEAR

Los datos de detección de ácidos nucleicos mediante fluorescencia en las distintas fracciones residuales indican que no solamente las digestiones con nucleasas producen eliminaciones importantes de ADN y ARN nuclear, sino también las extracciones en tampón de baja y alta fuerza iónica; y que la matriz nuclear se halla practicamente desprovista de ambos tipos de ácidos nucleicos o los contiene en un nivel muy escaso no detectable por estas técnicas (Potashkin y col.1984).

Estos resultados estan de acuerdo con los datos de valoración bioquímica obtenidos en otros sistemas, en donde las digestiones enzimáticas con DNasa I y RNasa A, así como las extracciones en baja y alta fuerza iónica eliminan cantidades importantes de ADN y ARN nuclear (Berezney 1984) y confirman que el control de fluorescencia con DAPI utilizado es un método rápido y eficiente de valoración del grado de extracción de las matrices.

De acuerdo con los datos de fluorescencia la matriz nuclear contiene niveles muy bajos de ADN, ya que en estas condiciones aproximadamente el 95% de ADN ha sido eliminado (Pothaskin y col.1984). Aunque el ADN residual no es detectable por fluorescencia de DAPI, hemos sido capaces de revelarlo, al usar para su detección un anticuerpo monoclonal contra ADN, que demuestra ser una técnica de detección mucho mas sensible. En cualquier caso el nivel de marcado de las matrices es evidentemente mucho más bajo que el que muestran el núcleo aislado o "in situ" incubado en las mismas condiciones, ya que estamos detectando exclusivamente los puntos de anclaje de los loops de ADN, que han sido protegidos de la acción de la DNasa I por las proteínas de la matriz.

En *Allium cepa*, el ADN matricial (ADN_{nm}) se detecta asociado con fibras en los tres componentes de la matriz, dato que concuerda con los resultados obtenidos en sistemas animales (Shaper y col. 1979) y con la interpretación del papel de la matriz en la organización espacial y funcional del ADN (Berezney 1984). En sistemas animales está bien establecido que tanto la lámina como las estructuras del interior de la matriz proporcionan lugares de unión ADN-matriz de diverso significado funcional. La lámina se considera un lugar de anclaje para las fibras de ADN nuclear (Hancock y Hugues 1982) proporcionando lugares de asociación de ADN estructurales y permanentes que mantienen las posiciones fijas de los cromosomas durante interfase (Razin 1987). Las estructuras internas proporcionan diversos tipos de unión al ADN, unos son estructurales y se conservan durante todo el ciclo celular, como son los de los orígenes de replicación, y otros son funcionales y estan relacionados bien con la replicación (horquillas de replicación) o con la transcripción, como los que regulan los genes en transcripción activa y los potencialmente transcribibles (Razin 1987). El mantenimiento

de estas asociaciones depende del protocolo experimental usado, en concreto la extracción con baja fuerza iónica puede destruir la asociación de genes activos con la matriz (Razin 1987), y por tanto hemos de considerar la posibilidad de que el procedimiento de extracción utilizado en nuestro caso, haya producido la pérdida de algún tipo de unión.

La aproximación experimental que hemos usado, muy adecuada para localización "in situ", no permite discriminar entre los diversos tipos de unión ADN-matriz; sin embargo teniendo en cuenta los datos de inmunolocalización de ADN con el mismo anticuerpo en núcleos "in situ" (Martin y col. 1990) y aislados de *Allium cepa* y la información sobre los tipos de asociación del ADN a la matriz, podemos establecer una hipótesis sobre el ADN_{nm} en cada uno de los dominios estructurales de la matriz.

El ADN matricial detectado en la matriz interna puede corresponder a sitios de asociación del ADN nuclear que se localiza por la misma técnica en las regiones intercromatínicas y las masas de cromatina condensada del núcleo "in situ" (Martin y col. 1990) y aislado. Los bordes de la cromatina condensada y el interior de la región intercromatínica son zonas muy activas respectivamente en transcripción y replicación del ADN en el núcleo "in situ" (Berezney 1984, Fakan y Nobis 1978) y contendrían por tanto puntos de asociación transitoria del ADN a la matriz, mientras que los de la cromatina condensada contendrían puntos de asociación permanentes (Razin 1987); sin embargo, actualmente es imposible discriminar entre ambas regiones matriciales con criterios exclusivamente estructurales.

El ADN de la matriz nucleolar corresponde probablemente a fragmentos de ADN_r. Actualmente es aceptado que los centros fibrilares y el componente fibrilar denso

contienen genes de ADN_r (Fakan y Hernandez Verdun 1986, Thiry y col. 1989, Martin y col. 1990), y precisamente éstos dos componentes forman parte de la matriz nucleolar de *Allium cepa* y presentan asociado ADN residual. La asociación específica del ADN_r con la matriz nucleolar ha sido confirmada experimentalmente en hígado de rata (Bureau y col 1986, Bolla y col. 1985).

El ADN matricial detectado en la lámina probablemente corresponde a fragmentos residuales de ADN correspondientes a los telómeros de los cromosomas.

Nuestros resultados demuestran que la matriz nuclear de *Allium cepa*, no sólo es estructuralmente análoga a la matriz nuclear de sistemas animales, sino que además contiene dominios de cromatina y ribonucleoproteicos, como discutiremos posteriormente, del mismo modo que sucede en estos sistemas (Berezney 1984), indicando que la homología entre ambas estructuras no es sólo estructural sino funcional.

2.3. ARN Y DOMINIOS RIBONUCLEOPROTEICOS EN LA MATRIZ NUCLEAR

Como dijimos en el apartado 2-1 existen varios fluorocromos específicos para ADN y otros que se unen tanto a ADN como ARN, pero no existe ninguno específico de ARN. Por tanto, para la detección de ARN por fluorescencia hemos bloqueado primero los grupos reactivos del ADN con DAPI y posteriormente marcado los del ARN con PIRONINA. La PIRONINA es el fluorocromo de mayor afinidad por el ARN (Pollack y col. 1982, Darzinkiewicz y col. 1987) y presenta una gran sensibilidad (Cowden y Curtis 1983).

La fluorescencia negativa de la PIRONINA sugiere un contenido escaso de ARN en la matriz nuclear, dada la sensibilidad de este fluorocromo para detectar pequeños niveles de ARN y su afinidad por esta molécula (Darzynkiewicz y col. 1987). Pero a diferencia de los complejos DAPI-ADN (Potashkin y col. 1984) es imposible cuantificar los niveles de ARN en las estructuras biológicas mediante fluorescencia de PIRONINA, debido principalmente a la falta de estequiometría de los complejos ARN- PIRONINA (Darzynkiewicz y col. 1987). Estos complejos sólo fluorescen cuando la PIRONINA se intercala en regiones de doble cadena (Darzynkiewicz y col. 1987). A pesar de ello la PIRONINA sería en principio un buen método de detección de ácidos nucleicos residuales en la matriz nuclear, puesto que los ARNs que son componentes de la misma (Holubeck 1984) tienen una alta proporción de regiones de doble cadena (Reddy y Busch 1981) e incluso el ARNhn se estima que posee un 8% de secuencias de doble cadena (Paoletti y col. 1980) que existen "in vivo" (Calvet y Pederson 1977, 1979a y b) y están relativamente libres de proteínas (Martin y col 1978), por tanto los niveles de ARN presentes en la matriz quedarían por debajo de los umbrales de detección de la técnica aunque queda abierta la posibilidad de que exista en la matriz ARN de cadena sencilla no detectable por este fluorocromo.

Mediante tinción regresiva después de quelación con EDTA, se contrastan diferencialmente los elementos de la matriz nuclear. En la matriz interna, aparecen contrastados los gránulos de 25 nm que veremos posteriormente corresponden a los G.I., y pequeños gránulos de 10-15 nm interconectados por fibras, muy semejantes en organización ultraestructural y dimensiones a las fibras arrosariadas de las matrices reducidas, y parece ser a priori una técnica más sensible para detección de ARN en las matrices.

La matriz nuclear está prácticamente desprovista de ADN, por lo que es imposible distinguir en ella las fibras de cromatina blanqueadas preferencialmente en relación a otras estructuras proteicas y ribonucleoproteicas. Para interpretar el significado de las estructuras que se contrastan, es preciso tener en cuenta otras estructuras que pueden retener uranilo en la forma que lo hace el ARN, es decir las que contengan proteínas fosforiladas (Pearson y Davies 1982) y comprobar la reproducibilidad de la tinción de la matriz, en las mismas condiciones en las que dá resultados fiables en el núcleo de *Allium cepa* que presenta una alta proporción de cromatina condensada.

Los gránulos de 25 nm pueden interpretarse como G.I., teniendo en cuenta su forma, tamaño, distribución en la matriz y tinción con EDTA y su afinidad por el bismuto. Estas estructuras estan caracterizadas en *Allium cepa* (Medina y col. 1989) y contienen un ARN muy estable, probablemente un ARN de pequeño tamaño ya que en ellos se han detectado los antígenos Sm de estos ARNs (Turner y Franchi 1987).

En base a su tinción con EDTA, los gránulos de 10-15 nm observados en las matrices podrían ser partículas ribonucleoproteicas o bien estructuras que contengan proteínas fosforiladas que se comportan de forma análoga al ARN después de la quelación (Pearson y Davies 1982). La posibilidad de que contengan proteínas altamente fosforiladas queda descartada al no reaccionar con bismuto, dada la alta reactividad de esta tinción para los G.I. y la proteína nucleolina en el núcleo de plantas (Medina y col. 1989, Martin 1990); y la de que fueran fibras de ADN no blanqueadas por el EDTA debido a un fallo del procedimiento experimental es muy improbable ya que el bajo contenido en ADN de las matrices no justifica la abundancia de elementos de la matriz interna que se contrastan con EDTA. Su organización en fibras arrosariadas y su tamaño coinciden con los de las estructuras de RNP extranucleolares observables aplicando

métodos de extensión suave en células vegetales (Minguez y col. 1990, Vazquez-Nin y col. en prensa) y con las de los complejos ribonucleoproteicos resistentes a alta fuerza iónica localizados en las matrices de otros sistemas, los cuales contienen ARNsn y ARNhn en diversos estados de procesamiento (Gallinaro y col. 1983, Holoubek 1984), y sugiere que las estructuras diferencialmente contrastadas por EDTA en *Allium cepa* pueden ser complejos de RNPs resistentes a sal, no detectables por PIRONINA. Interpretación que es consistente con los datos de sistemas animales, donde se ha comprobado reiteradamente la asociación de productos génicos a la matriz nuclear (Jackson y col. 1981, Ross y col. 1982, Ciejeck y col. 1982, Maundrell y col. 1981, Mariman y col. 1982, Van Eekelen y Van Venrooij 1981, Long y col. 1979, Miller y col. 1978, Herman y col. 1978).

El resto de las estructuras que no se contrastan diferencialmente están fuera de las posibilidades de identificación por medio de este método citoquímico. Aun siendo conscientes de ello, y teniendo en cuenta los datos de organización de la matriz interna en otros sistemas, con dos mallas relacionadas una ribonucleoproteica y otra exclusivamente proteica (Comerford y col. 1986) se puede establecer la hipótesis de que la malla fibrilar de la matriz interna puede corresponder a una malla proteica que presenta un contraste menor que la que contiene estructuras ribonucleoproteicas (Pearson y Davies 1982).

El hecho de que la lámina no presente contraste diferencial es consistente con la naturaleza de esta estructura ya que es una capa proteica formada mayoritariamente por filamentos ortogonales de láminas (Aebi y col. 1986) que no se encuentran fosforiladas (Jost y Jhonson 1981, Jost y col. 1986).

El contraste uniforme de la matriz nucleolar después de quelación con EDTA es más difícil de interpretar, pues podría deberse no sólo a RNPs residuales, sino también a la presencia de la nucleolina altamente fosforilada, como demuestra la tinción con bismuto. Sin embargo, sólo una parte de las fibras que forman la matriz nucleolar tienen capacidad de ligar bismuto y corresponderían por tanto a la nucleolina, mientras que el resto deben su contraste a la presencia de ribonucleoproteínas. Estos datos concuerdan con los de otros autores que han detectado el ARN de pequeño tamaño U3 específico de la maduración de los precursores ribosómicos (Ciejek y col. 1983, Parker y Steitz 1987) y precursores tempranos de los ARNs ribosómicos (Ciejek y col. 1982) en la matriz nucleolar. Los centros fibrilares de la matriz nucleolar no presentan contraste, ya que estas estructuras contienen los genes inactivos del ADN ribosómico pero no sus productos en el nucleolo "in situ" (Martin y col. 1989, Risueño y col. 1982).

3 PROTEINAS FOSFORILADAS DE LA MATRIZ NUCLEAR

3.1. DISCUSION DEL METODO DE DETECCION EMPLEADO: TINCION CON OXINITRATO DE BISMUTO

La impregnación de los tejidos con bismuto se basa en la reacción selectiva del ión Bi^{+++} con los grupos amino de proteínas y fosfatos orgánicos quedando excluidos los grupos fosfatos de los ácidos nucleicos (Locke y Huie 1977). Esta exclusión se debe probablemente a la débil sensibilidad del bismuto que limita su unión a grupos fosfato no esterificados que son muy reactivos (Locke y Huie 1977, Wassef 1979, Brodie y col. 1982, Medina y col. 1989), aunque no todos los grupos fosfato asociados a proteínas reaccionan con bismuto (Brodie y col. 1982, Medina 1987, Medina y col. 1989).

Dependiendo del tipo de fijación utilizada, la impregnación es más o menos específica de un determinado tipo de estructuras. Los fijadores menos entrecruzantes como el paraformaldehído originan las reacciones menos específicas, al bloquear en menor proporción los grupos amino capaces de reaccionar con el bismuto. Los más entrecruzantes como el glutaraldehído producen un bloqueo efectivo de los grupos amino de las proteínas y como consecuencia se obtiene una reacción más específica de los grupos fosfato de proteínas fosforiladas (Wassef 1979, Locke y Huie 1975, 1976, Medina y col. 1989).

Las estructuras celulares que se contrastan después de fijación con paraformaldehído incluyen los gránulos peri e intercromatínicos, el nucleolo en su conjunto, y los ribosomas. Pero después de fijación con glutaraldehído, el nucleolo queda teñido sólo en parte y desaparece también la tinción ribosómica (Locke y Huie 1975, 1976, Wassef 1979). En *Allium cepa*, después de fijación con glutaraldehído, la tinción con bismuto ha mostrado ser aún más específica, al quedar impregnados sólo los G.I. y una parte del componente fibrilar denso del nucleolo. Esta mayor selectividad puede deberse a las concentraciones de glutaraldehído más altas empleadas y / o a características específicas del tipo celular (Medina 1987, Medina y col. 1989).

Los G.I. aparecen como estructuras universal y selectivamente teñidas con bismuto tanto en sistemas animales como vegetales (Locke y Huie 1977, Wassef 1979, Kryzowska-Gruca 1983, Medina 1987, Medina y col. 1989). Los grupos reactivos responsables de su tinción son principalmente los grupos fosfato de proteínas. Según se ha demostrado en hepatocitos usando bloqueo histoquímico mediante acetilación, metilación y deaminación oxidativa (Wassef 1979), y en *Allium cepa* mediante técnicas de detección microanalítica de fósforo y bismuto y detección citoquímica del pool de

fosfatos nucleares insolubles en forma de ortofosfato de plomo ligado a proteínas (Medina 1987, Medina y col. 1989, Fernandez Gomez y col. 1990).

Hasta el presente no se han caracterizado las proteínas responsables de la tinción con bismuto en estas estructuras.

La impregnación nucleolar después de fijación con glutaraldehído se atribuye también a proteínas altamente fosforiladas. Pues en especímenes fijados en paraformaldehído, una deaminación oxidativa posterior, produce una tinción de bismuto en el nucleolo, semejante a la obtenida en especímenes fijados en glutaraldehído (Wassef 1979). En concreto la nucleolina (C23) parece ser la proteína nucleolar responsable de la reacción del bismuto en el nucleolo tanto en células animales como vegetales (Gas y col. 1984, Martin 1990).

La gran selectividad que ofrece la tinción con bismuto, después de bloqueo de los grupos amino por fijación con glutaraldehído, la convierte en una herramienta muy adecuada para detectar proteínas altamente fosforiladas en la matriz nuclear.

3.2. PROTEINAS FOSFORILADAS DE LA MATRIZ NUCLEAR

PROTEINAS FOSFORILADAS DE LA MATRIZ INTERNA

La reacción con bismuto, al igual que la tinción de ribonucleoproteínas con EDTA, revela la heterogeneidad de los componentes de la matriz nuclear, ya que solamente los gránulos intercromatínicos y una parte de las fibras de la matriz nucleolar presentan una proporción detectable de proteínas fosforiladas.

Los gránulos de 25-30 nm son las únicas estructuras de la matriz interna que se impregnan selectivamente con bismuto indicando que contienen proteínas fosforiladas. La excelente resolución de esta tinción a grandes aumentos permite comprobar que las proteínas fosforiladas se encuentran en fibras finas de ≈ 4 nm que constituyen la estructura del gránulo y aparecen claramente teñidas.

Estos gránulos son homologables, en base a sus características estructurales y contenido en ARN y proteínas fosforiladas, con los G.I. de plantas (Medina y col. 1989) que serían por tanto componentes de la matriz nuclear de plantas como se ha descrito en células animales (Turner y Franchi 1987, Carmo-Fonseca y col. 1989, Kryzowska-Gruca y col. 1983). Sin embargo, los gránulos pericromatínicos no resisten la extracción y no forman parte de la matriz nuclear. Los gránulos ribonucleoproteicos de la matriz interna de menor tamaño, no parecen contener proteínas altamente fosforiladas ya que no ligan bismuto.

Los G.I. contienen algún tipo de ARN metabólicamente estable y bien protegido de la digestión enzimática (Swift 1963). No es sorprendente que sean estructuras resistentes a la digestión con RNasa durante una hora en el proceso preparativo de matrices. En este sentido, conviene resaltar que las matrices aisladas en condiciones que permiten actividad de RNasa endógena (sin DPC en el medio de aislamiento de núcleos) sólo contienen gránulos de 15-18 nm de diámetro, al igual que sucede en las regiones intercromatínicas de los núcleos control aislados en las mismas condiciones. Y probablemente corresponden a G.I. digeridos endógenamente.

Los G.I. muestran una distribución dentro de la matriz interna similar a la que se

encuentra en las regiones intercromatínicas de los núcleos in situ (Medina y col. 1989) y aislados, nunca forman grandes agrupaciones sino que aparecen distribuidos en pequeños grupos extendiéndose por el interior de las regiones intercromatínicas, próximos al nucleolo y hasta el límite de la membrana nuclear interna. Por tanto, no parecen sufrir reordenaciones importantes durante el proceso de preparación de las matrices.

En células animales se sabe que los G.I. contienen RNPs (Fakan y col. 1984, Carmo-Fonseca y col. 1989, Puvion y col. 1984) y parecen ser lugares de transferencia de ciertos ARNs de origen nucleolar (Puvion y col. 1984). Los antígenos correspondientes a las RNPs se han detectado también en los G.I. de la matriz (Carmo-Fonseca y col. 1989) confirmando el papel de esta estructura en el metabolismo del ARN. La detección de G.I. por primera vez en matrices nucleares de plantas, es un dato que sugiere importantes similitudes funcionales entre las matrices nucleares de células animales y vegetales a pesar de las diferencias en composición polipeptídica y en la estabilidad de sus componentes internos.

PROTEINAS FOSFORILADAS DE LA MATRIZ NUCLEOLAR

Aunque la organización estructural de las fibras de la matriz nucleolar es aparentemente homogénea, la tinción con bismuto revela una heterogeneidad en su composición proteica.

La tinción con bismuto impregna una parte del componente fibrilar del nucleolo "in situ" (Martin 1990), la misma zona del nucleolo en los núcleos aislados y parte de las fibras de la matriz nucleolar. Estos resultados indican que la matriz nucleolar es de

composición heterogénea y que parte de ella aunque no toda, está relacionada con el componente fibrilar denso del nucleolo.

Se ha comprobado que la nucleolina es la proteína responsable de la tinción nucleolar con bismuto después de fijación con glutaraldehído en células animales (Gas y col. 1984) y vegetales (Martin 1990). Es una proteína ácida altamente fosforilada y mayoritaria en el nucleolo de células en crecimiento exponencial y juega un papel multifuncional en diversas fases de la transcripción y maduración del ARN pre-ribosómico y en el ensamblaje de los ribosomas (Bugler y col. 1982, Jordan 1987). La proteína ha sido secuenciada (Lapeyre y col. 1987) y se han obtenido anticuerpos monoclonales y policlonales contra ella (Lischwe y col 1981, Escande y col. 1985). Está estructurada en tres regiones que le confieren esa capacidad multifuncional. La región amino-terminal interacciona con el ADN_r a través de la histona H1, en la región correspondiente al espaciador no transcrito, induciendo descondensación de la cromatina (Erard y col 1988). En este extremo contiene 6 secuencias repetidas con residuos básicos no polares, intercaladas por series de aminoácidos ácidos lo que le confiere la potencialidad de formar α -hélice, y un alto número de serinas que son el lugar de fosforilación (Lapeyre y col.1987) y es por medio de estos grupos fosfato por los que se une al bismuto. La proteína en estado fosforilado activa la transcripción, probablemente actuando como un factor regulador de la conformación de la cromatina y quizá activando la unión de la ARN polimerasa I al template (Jordan 1987).

El extremo carboxilo-terminal contiene glicinas y numerosas argininas dimetiladas (Lapeyre y Amalric 1986). Esta región de la molécula aparece en una conformación extendida, con secuencias similares a las de las proteínas de los "spliceosomas" y se piensa que es por esta región por donde interacciona con el ARNpre-r (Herrera y Olson

1986) y permanece asociada a esta molécula durante todo su procesamiento (Bourbon y col. 1983 a y b).

La proteína fosforilada se metaboliza una vez transcrito el ARN preribosómico (Bouche y col. 1984), dando lugar a otras proteínas de menor Pm que constituyen la familia de la nucleolina.

La proteína parece encontrarse unida al ADNr en los centros fibrilares en estado defosforilado, que es la forma mediante la cual inhibe el mecanismo de la transcripción (Caizergues-Ferrer y col. 1987) y unida al ARNpre-r en estado fosforilado en el componente fibrilar denso interviniendo en su procesamiento (Bouche y col. 1984, Martin 1990). Estudios recientes han demostrado que un anticuerpo policlonal contra la nucleolina (Escande y col. 1985) reconoce a una proteína de 64 KD en *Allium cepa*, localizada inmunologicamente en los centros fibrilares y en el componente fibrilar denso del nucleolo, pero detectable en forma fosforilada exclusivamente en el componente fibrilar denso. Una vez transferida a filtros de nitrocelulosa se tiñe selectivamente con bismuto y con plata de la misma forma que la nucleolina de células animales y es considerada la proteína homóloga de la nucleolina en células vegetales (Martin 1990).

La especificidad de la reacción con bismuto que reconoce una sola banda y la misma que el anticuerpo antinucleolina en "blots" de proteínas totales de nucleolos aislados de *Allium cepa* (Martin 1990), y la clara reacción detectable al microscopio electrónico en las matrices nucleolares nos permiten concluir que la nucleolina es un componente de la matriz nucleolar en este sistema, tal como se había descrito en células animales aunque las condiciones de asociación de la nucleolina con la matriz no parecen estar claras. Algunos autores (Long y Ochs 1983, Shiomi y col. 1986) mantienen que la

nucleolina se solubiliza en tampones de alta fuerza iónica (2M ClNa), Olson y col. (1986) sin embargo, han demostrado que la nucleolina sólo se solubiliza en tampones que contengan 2M ClNa y mercaptoetanol. Caizergues-Ferrer y col. (1984) han demostrado que el choque térmico produce una estabilización de la nucleolina en la matriz nuclear; concomitantemente se produce un bloqueo de los precursores ribosómicos en la fracción insoluble, demostrando que el choque térmico inmoviliza los precursores ribosómicos en la matriz nuclear, de forma análoga a lo que ocurre con el ARNhn en la matriz interna (Lutz y col. 1988).

En nuestro caso, la asociación de la nucleolina con la matriz nucleolar no parece sensible a la extracción con 2M ClNa, e incluso la fracción de nucleolina fosforilada detectable por bismuto en cortes, aparece enriquecida en las matrices nucleolares en relación a los nucleolos "in situ" probablemente debido a la solubilización masiva de proteínas.

La región periférica de la matriz nucleolar, no aparece enriquecida en nucleolina y probablemente corresponda al esqueleto del componente granular del nucleolo "in situ" que tampoco está enriquecido en nucleolina fosforilada.

Los perfiles polipeptídicos de las matrices nucleares de *Allium cepa* presentan una banda proteica constante a 63 KD independientemente del procedimiento de extracción utilizado para su obtención, cuyo Pm coincide con el de la nucleolina en este mismo sistema. Esta proteína podría corresponder a la nucleolina matricial, sin embargo este dato no se puede confirmar hasta que no se confirme la reacción de esta banda con el anticuerpo antinucleolina y la tinción con bismuto.

4 ORGANIZACION ESTRUCTURAL DE LA MATRIZ NUCLEAR

Resumiendo, la matriz nuclear en *Allium cepa* está constituida por los tres componentes morfológicos típicos de la matriz de sistemas animales: El complejo lámina-poros, matriz interna y matriz nucleolar (Berezney 1984, van Eekelen y col. 1982, Verheijen y col. 1988). Sus elementos internos son resistentes a procedimientos de extracción que los solubilizan en otros tipos celulares como la digestión con RNasa previa a la extracción en alta fuerza iónica y el mantenimiento de condiciones reductoras durante la extracción. Sin embargo, los cationes divalentes resultan imprescindibles para mantener una organización estructurada de los componentes de la matriz.

La lámina con los poros complejos asociados, tiene una organización similar a la encontrada en sistemas animales y está constituida por fibras del mismo diámetro (Krohne y Benavente 1986, Aebi y col. 1986). En ella se detecta una baja proporción de ADN matricial asociado, pero los componentes ribonucleoproteicos parecen estar ausentes de este dominio de la matriz. Igual que la lámina de la matriz nuclear de sistemas animales procede de elementos residuales de la envuelta nuclear, aunque al contrario de lo que sucede en estos sistemas, la lámina no es directamente observable en el núcleo "in situ".

La matriz interna presenta una organización estructural heterogénea. Estructuralmente es análoga a la matriz interna de sistemas animales e igualmente deriva principalmente de las estructuras intercromatínicas del núcleo "in situ" (Berezney 1984). Está formada por dos mallas de diferente organización estructural, contraste a los electrones y composición química como demuestra la distinta composición en ribonucleoproteínas y proteínas altamente fosforiladas. La matriz interna es parcialmente

sensible a las condiciones de digestión con RNasa, y la formación de puentes disulfuro parece ser un factor estabilizante de proteínas en ella. Sin embargo el mantenimiento de una matriz interna parece independiente de ambos factores. A ella se asocian preferentemente el ADN matricial y los componentes ribonucleoproteicos resistentes a sal pero con una distribución heterogénea en la que se distinguen dominios de cromatina y los dominios ribonucleoproteicos característicos, como en sistemas animales (Berezney 1984). Se distingue asimismo en ella una malla fibrilar homogénea de naturaleza proteínica y estable frente a diferentes procedimientos extractivos, formada por fibras de 5 nm de diámetro que podría constituir la estructura matricial básica o nucleoesqueleto (He y col. 1990). Al igual que sucede en sistemas animales los G.I. forman parte de la matriz interna, apoyando la identidad funcional entre matrices nucleares de sistemas animales y vegetales.

La matriz nucleolar está constituida por una malla fibrilar estructuralmente homogénea en la que se distinguen centros fibrilares residuales, cualquiera que sea el procedimiento experimental usado en la obtención de la matriz nuclear. Esta trama fibrilar ribonucleoproteica presenta una composición heterogénea detectándose proteínas altamente fosforiladas sólo en una parte de ella, que por su contenido en nucleolina fosforilada estaría relacionada con el componente fibrilar denso del nucleolo. Por tanto, la proteína análoga a la nucleolina de plantas parece ser un componente de la matriz nucleolar. La asociación de esta proteína matricial resiste el tratamiento con alta fuerza iónica, a diferencia de lo que ocurre en otros sistemas celulares. La presencia de nucleolina y ADN residual en la matriz nucleolar de *Allium cepa* revela su implicación en la transcripción y maduración de los genes ribosómicos al igual que sucede en sistemas animales (Ciejek y col. 1982), constituyendo el soporte físico de los procesos de transcripción y "splicing" en el nucleolo (Schröder 1987, 1989).

La organización estructural de la matriz nuclear parece estar mantenida básicamente por proteínas situadas en el rango 63-50 KD a las que se asocian distintas proteínas nucleares dependiendo del procedimiento experimental usado.

5 ORGANIZACION TRIDIMENSIONAL

Se han utilizado varios métodos experimentales para el análisis de la organización espacial de los componentes de la matriz nuclear, como son el estudio de matrices nucleares enteras sin incluir (Bouvier y col. 1980) o bien incluidas en resinas especiales que pueden eliminarse posteriormente para obtener una imagen de bloques o secciones gruesas de las matrices (Fey y col. 1986). Otros métodos usan extracciones con fuerza iónica moderada (Capco y col. 1982, 1984) o bien un aumento gradual de la fuerza iónica (He y col. 1990) para evitar un reordenamiento de los componentes matriciales durante la extracción. Otro abordaje es la reconstrucción tridimensional mediante ordenador a partir de cortes seriados incluidos en resinas convencionales (Bouteille y col. 1983, Bouvier y col. 1984). Recientemente se ha desarrollado un método basado en la inclusión de las células en microbolas de agarosa que preserva la posición de los componentes del nucleoesqueleto y citoesqueleto a lo largo de la extracción, permitiendo a la vez un intercambio efectivo de moléculas de hasta 150 KD de Pm que garantiza la eliminación de los componentes nucleares que no son parte de la matriz nuclear o del citoesqueleto (Jackson y Cook 1988). Desgraciadamente este método no es aplicable a células vegetales, a causa de la pared celular rígida que dificulta la infiltración en agarosa (Moreno Diaz de la Espina y col. 1990). Por ello elegimos el método de reconstrucción tridimensional para estudiar la distribución espacial de los componentes

de nuestras matrices que había sido utilizado con éxito en el estudio de otros componentes del núcleo "in situ" de este sistema (Medina y col. 1983).

La matriz nuclear analizada con las técnicas citadas en otros sistemas celulares (células HeLa, fibroцитos, células MCF-7) aparece como una malla filamentosa, altamente organizada que retiene una organización tridimensional. Se visualiza en preparaciones enteras desprovistas de resina como filamentos ramificados que se extienden por el interior nuclear y se anclan en la lámina (Jackson y Cook 1988, Capco y col. 1982, He y col. 1990). Estas imágenes pueden conseguirse a partir de aproximaciones experimentales diversas, como someter células encapsuladas en microbolas de agarosa a electroelucción para eliminar parte de la cromatina y digerir posteriormente con enzimas de restricción (HAE III) que son condiciones que evitan las extracciones de alta fuerza iónica (Jackson y Cook 1988); o bien en células digeridas con DNasa I y sometidas a extracciones aumentando gradualmente la fuerza iónica hasta 2M ClNa (He y col. 1990); o en células digeridas con DNasa I y RNasa A y extraídas con fuerza iónica moderada (Capco y col. 1982). En estas condiciones el nucleoesqueleto se visualiza uniformemente extendido por el interior nuclear, con filamentos ramificados que se anclan en la lámina. La malla del nucleoesqueleto presenta una ramificación mayor que la del citoesqueleto; los nucleolos residuales aparecen como zonas de alta agregación y densas a los electrones. El diámetro descrito para sus filamentos es variable, desde aproximadamente 10 nm (Jackson y Cook 1988, He y col. 1990), 3 nm pero también hasta 22 nm (Capco y col. 1982). Su composición descrita es también variable. Aproximadamente el 70% del ARN nuclear parece imprescindible para recuperar el nucleoesqueleto, pero menos del 1% queda como remanente en él según los datos de He y col. (1990); de acuerdo con Capco y col. (1982) ni siquiera las digestiones conjuntas DNasa I y RNasa A antes de la extracción salina afectan la

integridad del mismo, o como han descrito otros autores el nucleoesqueleto retiene el 25% del ADN nuclear, y tanto una digestión con DNasa I como una digestión con RNasa A conducen a su desaparición (Jackson y Cook 1988). El estudio de la organización tridimensional de la matriz nuclear mediante reconstrucción tridimensional de cortes seriados de matrices nucleares incluidas en resina ha puesto de manifiesto un alto grado de conservación de la distribución intranuclear de la matriz interna y de la nucleolar (Bouvier y col. 1980).

La reconstrucción tridimensional efectuada en matrices nucleares de *Allium cepa* permite extraer dos conclusiones: los componentes de la matriz nuclear ocupan territorios definidos y no aparecen distribuidos al azar y existe una continuidad física entre sus componentes sugiriendo la presencia de una estructura nucleoesquelética subyacente, tal como han revelado He y col. (1990). En efecto, los componentes matriciales retienen una organización tridimensional propia que es coherente con un alto grado de conservación de la distribución intranuclear de este material a lo largo del proceso de extracción.

6 REALIDAD "in situ" DE LA MATRIZ NUCLEAR

La controversia acerca de la existencia de la matriz nuclear "in situ" aun persiste (Agutter 1988, Schröder y col. 1987). Esto quizá sea debido a que las estructuras internas de la matriz no están todavía bien caracterizadas. Actualmente se sabe que las RNPhn y las RNPsn forman parte de estas estructuras internas (Gallinaro y col. 1983, Spector 1984, Verheijen 1988); que la matriz interna constituye el soporte físico donde los genes, organizados en lazos, se replican y transcriben (Berezney 1984, Pardoll y col. 1980) y que algunas características del transporte intranuclear de los productos

génicos se explican mejor con la hipótesis de un transporte en estado sólido, ya que no depende de la integridad de la envuelta nuclear y además el "splicing" es un prerequisite para que el ARNm sea transportado al citoplasma (Schröder 1987, 1989). Sin embargo, permanece abierta la polémica de si las propias moléculas de ADN y los productos génicos tienen, en sí mismos, la capacidad de una supraorganización que permita que la replicación, transcripción y transporte ocurran de modo organizado, o bien necesitan una estructura esquelética que integre de modo coordinado estos procesos.

Los adversarios de la hipótesis de la existencia de un nucleoesqueleto postulan que los procedimientos de extracción producen reordenamientos artefactuales dentro del núcleo que conducirían a la formación de una estructura artificial, no existente "in vivo" (Burkholder 1983, Mirkovitch y col. 1984). En concreto la extracción con 2M ClNa se considera la principal responsable de los mismos (Burkholder 1983, Mirkovitch 1984). Las enzimas implicadas en la replicación y transcripción, así como el ADN de nueva síntesis y los productos génicos, son moléculas que "in situ" deben estar próximas y podrían ser artefactualmente aglutinadas durante el procedimiento de obtención de la matriz nuclear por el tratamiento con alta fuerza iónica, como de hecho se puede inducir con el ARNhn (Arenstorf y col. 1984, Lothstein y col. 1985) pudiéndose concluir de modo erróneo que existe una estructura esquelética integradora de esos procesos (ver Agutter 1988). Sin embargo, importantes datos experimentales hablan en favor de una malla semejante al citoesqueleto en el núcleo que tiene correspondencia estructural "in situ" (Nakayasu y Ueda 1985, Berezney 1984, He y col. 1990).

En células de *Allium cepa*, las fibrillas y gránulos que forman la matriz nuclear aislada están bien definidas estructuralmente, y tienen características regulares y reproducibles en las matrices obtenidas por los diferentes procedimientos. Las

estructuras ribonucleoproteicas de la matriz son homologables con algunas de las de la malla de RNP de las regiones intercromatínicas observadas tanto en núcleos aislados como "in situ" después de tinción de ribonucleoproteínas y proteínas fosforiladas, y lo mismo ocurre con la malla nucleolar que contiene nucleolina observada tanto en núcleos aislados como intactos después de tinción con bismuto. Todas estas estructuras son detectables al nivel de M.E. en los núcleos residuales después de cada uno de los pasos de los distintos procedimientos de extracción utilizados, a pesar de las drásticas condiciones usadas en ellos, y lo mismo ocurre con las proteínas consideradas como componentes básicos de las matrices. Todos estos hechos nos llevan a concluir que aunque los tratamientos utilizados en las extracciones podrían estabilizar la red del nucleoesqueleto preexistente, principalmente por unión de proteínas mediante formación de puentes disulfuro o efecto de una elevación súbita de la fuerza iónica, esta estructura está realmente presente en el núcleo intacto.

6.1 EVOLUCION DE LOS COMPONENTES MATRICIALES DURANTE EL PROCEDIMIENTO EXTRACTIVO

Un requerimiento esencial para verificar la producción de reordenamientos artefactuales durante el procedimiento extractivo es monitorizar la evolución de las estructuras nucleares en cada una de las extracciones del procedimiento de preparación de las matrices.

ENVUELTA NUCLEAR-POROS COMPLEJOS versus LAMINA-POROS RESIDUALES

En *Allium cepa*, la evolución estructural de la envuelta nuclear durante el proceso

extractivo es del todo concordante con la que se produce en otros sistemas celulares extraídos por distintos procedimientos (Berezney 1979, 1984, Maul y col. 1977, 1984). La lámina es difícil de discernir al M.E. entre los elementos de la envuelta nuclear "in situ", debido a su estructura sutil, a diferencia de lo que ocurre en algunos eucariotas inferiores que poseen una lámina en panal de abeja muy diferenciada (Bouteille y col. 1983). En las preparaciones convencionales, la lámina queda enmascarada por las masas de cromatina condensada, y resulta imposible contrastarla específicamente con las tinciones de EDTA o Bismuto ya que no contiene ribonucleoproteínas y las laminas polimerizadas no se encuentran en estado fosforilado (Stick 1987, Jost y Jhonson 1981). Los poros son las únicas estructuras del complejo lámina-poros directamente observables en las preparaciones convencionales y con la tinción preferencial de EDTA.

La extracción preliminar con Tritón-X 100 que solubiliza la mayor parte de los fosfolípidos de la bicapa de la envuelta, produce una envuelta residual continua en la que se distinguen los poros complejos (TABLA XII). Esta envuelta residual mantiene las conexiones con las fibras de cromatina condensada y con las fibras de las regiones intercromatínicas observables en la envuelta nuclear del núcleo aislado. Las digestiones enzimáticas con nucleasas exógenas que producen la desaparición de grandes masas de cromatina del interior del núcleo y una variación de las estructuras de las regiones intercromatínicas, revelan una envuelta residual de organización fibrilar con poros complejos residuales, que mantiene las conexiones con las fibras de las regiones intercromatínicas. Su organización ultraestructural y el diámetro de las fibras que la componen son similares a los que se observan en la envuelta residual de fracciones nucleares de vertebrados obtenidas por diferentes procedimientos (Berezney 1979, 1984). La lámina en los pasos subsiguientes a la digestión con nucleasas no sufre modificaciones estructurales significativas y mantiene las conexiones con las fibras de la

matriz interna (TABLA XII). Por tanto es una estructura muy estable, reconocible en todos los pasos del procedimiento de extracción y que no sufre reorganizaciones caóticas de sus componentes debido al procedimiento experimental.

REGIONES INTERCROMATINICAS versus MATRIZ INTERNA

Numerosos datos experimentales en sistemas animales, correlacionan la matriz interna con las regiones intercromatínicas del núcleo "in situ" ya que presentan una localización topográfica y organización muy similar y en ambas se han localizado las RNPhn y RNPsn con anticuerpos específicos (Berezney 1977, Verheijen 1988, Nakayasu y Ueda 1985).

En *Allium cepa* existen varias evidencias experimentales que confirman la identidad de la matriz interna con ciertos componentes de las regiones intercromatínicas. En primer lugar la red de ribonucleoproteínas que se observa en estas regiones mediante tinción con EDTA "in situ" (Medina y col. 1989) o la aplicación de técnicas de extensión suave del núcleo con detergentes y tampones de baja fuerza iónica (Vazquez-Nin y col. 1991), es homologable a la observada en las matrices nucleares con la misma tinción, si exceptuamos los gránulos pericromatínicos que son muy sensibles a los detergentes y condiciones de fuerza iónica (Vazquez-Nin y col. 1991) y no resisten la extracción como estructura organizada. Además la tinción con bismuto revela que los gránulos intercromatínicos son componentes estables tanto de las regiones intercromatínicas "in situ" como de la matriz nuclear interna (Medina y col. 1989, Cerezuela y Moreno Diaz de la Espina 1990). Fibras análogas a las matriciales de 5 nm que no contienen ribonucleoproteínas ni proteínas altamente fosforiladas, son observables también en las regiones intercromatínicas del núcleo "in situ".

TABLA XII

EVOLUCION ESTRUCTURAL DE LA LAMINA DURANTE EL PROCESO EXTRACTIVO

ORGANIZACION ESTRUCTURAL		CONEXIONES DE LA ENVUELTA	
Núcleos aislados	Membrana nuclear con poros complejos	Fibras de las regiones intercromat.	Fibras de cromatina condensada
<hr/>			
Extracción con Triton-X 100	Capa fibrilar densa y poros complejos asociados	se mantienen	se mantienen
<hr/>		CONEXIONES DE LA ENVUELTA RESIDUAL	
Digestión con nucleasas	Capa de fibras de 10 nm y poros complejos residuales: lámina	se mantienen	
<hr/>			
Extracción en baja fuerza iónica	Lámina	se mantienen	
<hr/>		CONEXIONES DE LA LAMINA	
Extracción en alta fuerza iónica	Lámina	se mantienen con las fibras de la matriz interna	
<hr/>			

Los elementos estructurales que componen la matriz interna tampoco parecen proceder de reorganizaciones aleatorias entre proteínas durante la extracción, ya que la mayoría de sus componentes son identificables tanto en el núcleo "in situ" como en los núcleos residuales después de cada una de las extracciones (TABLA XIII).

Los componentes de la matriz interna no se afectan significativamente por la extracción con Tritón-X 100, que como otros detergentes no iónicos produce una descondensación bastante amplia de la cromatina debido a la desproteínización suave de la misma. Sin embargo, la digestión con nucleasas revela dos mallas fibrilares con diferente organización estructural y contraste a los electrones que son estables en cuanto a su organización estructural frente a las extracciones en baja y alta fuerza iónica. Este cambio en la estructura parece estar ligado a la eliminación masiva de ADN y ARN nuclear como consecuencia de las digestiones, tal como demuestran los datos de fluorescencia y detección con anticuerpos específicos.

El efecto más conspicuo de la digestión con DNasa I al nivel ultraestructural, es la práctica desaparición de las masas de cromatina condensada típicas de esta especie, pero la digestión también afecta a las regiones intercromatínicas que son zonas muy activas en replicación y transcripción del ADN en el núcleo "in situ" (Berezney 1984) y precisamente los genes activos y los potencialmente transcribibles muestran una digestión preferencial por la DNasa I (Medina 1988). La eliminación masiva de ADN es probablemente la causa de que en esta fase se ponga en evidencia la malla fibrilar no ribonucleoproteica que estaría enmascarada por el ADN asociado en el núcleo "in situ". Los experimentos de inmunomarcado en matrices enriquecidas en ADN revelan una alta acumulación de ADN residual en esta malla, que podría estar implicada en la

organización topológica del ADN y por tanto enriquecida en las proteínas que ligan ADN.

La segunda malla revelada por las digestiones, es de estructura fibrillogranular, y de naturaleza ribonucleoproteica y homologable a la red de ribonucleoproteínas observable en el núcleo "in situ" mediante tinción con EDTA (Medina y col. 1989). Los gránulos de esta malla son altamente resistentes a la digestión con RNasa y tampones de alta y baja fuerza iónica, de forma que la organización estructural de esta malla queda determinada después de la digestión con nucleasas, indicando que la extracción final en 2M ClNa no introduce modificaciones significativas a nivel estructural. Esta observación es importante teniendo en cuenta que la extracción directa en 2M ClNa se considera responsable de agregaciones artefactuales y desordenadas en los elementos internos (Burkholder 1983, He y col. 1990). Los G.I. asociados a esta malla muestran una distribución topológica similar en el núcleo intacto (Medina y col. 1989), aislado y en la matriz final, apoyando la idea de que la extracción salina no induce reorganizaciones drásticas en la matriz interna.

En resumen, la matriz interna parece ser de composición heterogénea. Una parte deriva principalmente de estructuras intercromatínicas ribonucleoproteicas del núcleo "in situ" y otra de las estructuras implicadas en la organización espacial de la cromatina. Su organización parece quedar establecida a partir de las digestiones enzimáticas con DNasa I y RNasa A y la extracción directa con 2M ClNa no es responsable de su aparición.

NUCLEOLO versus MATRIZ NUCLEOLAR

Aunque la matriz nucleolar es el componente matricial más evidente al microscopio

TABLA XIII

EVOLUCION ESTRUCTURAL DE LAS REGIONES INTERCROMATINICAS DURANTE EL PROCESO EXTRACTIVO

	CROMATINA	ORGANIZACION ESTRUCTURAL R.I.			
		FIBRAS		GRANULOS	
Núcleo "in situ"	condensada	F.no RNP	F.RNP F.inter. F.peri.	G.I. 25-30nm	G.P. 40-45nm
<hr/>					
Extracción Tx-100	descondensada	malla fibrilar		G.I.	G.P.
<hr/>					
Digestión con nucleasas	-	dos mallas		G.I.	
<hr/>					
Extracción en baja fuerza iónica	-	dos mallas		G.I.	
<hr/>					
Extracción en alta fuerza iónica	-	F.no RNP malla 5nm	F.RNP malla 15nm	G.I.	

electrónico, es muy difícil establecer correlaciones entre los componentes nucleolares "in situ" y los de la matriz nucleolar. Esto se debe a la fuerte compactación que sufren los elementos residuales del nucleolo cuando se emplean procedimientos extractivos drásticos (Berezney y Coffey 1974) o a la gran descondensación que experimentan en procedimientos extractivos que emplean el agente quelante EDTA (Bouteille y col. 1983), en los que se obtiene una malla fibrilar homogénea que ha perdido las estructuras típicas de referencia del nucleolo "in situ".

En *Allium cepa*, la matriz nucleolar es el componente más sensible a los procedimientos de extracción utilizados. Sufre modificaciones estructurales graduales durante el procedimiento extractivo, lo que permite establecer relaciones con estructuras "in situ" en cada paso de la extracción. Los tres componentes nucleolares característicos: centros fibrilares, componente fibrilar denso y granular se observan en el núcleo aislado y después de extracción con Tritón X-100, aunque en este caso el nucleolo sufre, igual que las masas de cromatina condensada, una relajación de la estructura en su conjunto. Las digestiones enzimáticas con DNasa I y RNasa A producen una fuerte extracción desapareciendo el componente granular como tal. La extracción final con 2M ClNa produce la matriz nucleolar, que presenta una estructura fibrilar reticulada con centros fibrilares en su interior, indicando que tanto los centros fibrilares como las fibras nucleolares de 5 nm podrían ser componentes matriciales (TABLA XIV).

El único componente de la matriz nucleolar claramente identificable en el nucleolo "in situ" y en las sucesivas fases del procedimiento de extracción son los centros fibrilares. Aunque en el primer caso aparecen mucho más extraídos, la detección preferencial del ADNr en éstas estructuras revela que su funcionalidad es la misma

que la de los centros fibrilares "in situ" (Martin y col. 1990) y confirma el papel de la matriz nucleolar y más concretamente de sus centros fibrilares en la asociación específica del ADNr (Bolla y col. 1985, Bureau y col. 1987).

Las partículas prerribosómicas no forman parte de la matriz nucleolar ya que su asociación a ella es sensible tanto a la extracción en alta fuerza iónica (Moreno Diaz de la Espina y col. 1990a, Barthelemy 1984) como a la digestión con nucleasas (Cerezuela y Moreno Diaz de la Espina 1990).

En cuanto a las fibras de la matriz nucleolar es muy difícil establecer en base a criterios morfológicos a qué dominio nucleolar pertenecen, ya que podrían corresponder tanto a las fibras del componente fibrilar denso que rodea a los centros fibrilares, donde se localizan los genes ribosómicos en transcripción activa (Martin y col. 1990), como a las fibras del fibrilar denso más alejadas de los mismos donde ya no se localiza transcripción, e incluso a las fibras del componente granular donde se asocian las partículas prerribosómicas (Hadjiolov 1985). La detección de nucleolina exclusivamente en una parte de las fibras revela la composición heterogénea de la matriz nucleolar; y permite detectar en ella las fibras del componente fibrilar denso que contienen la proteína altamente fosforilada. Su localización alrededor de los centros fibrilares es igual a la encontrada en el nucleolo "in situ" (Martin 1990) y aislado, y pone en evidencia que no ha habido traslocación de los componentes estructurales del nucleolo durante el procedimiento de preparación de las matrices, en contra de las sospechas manifestadas por otros autores (Burkholder 1983).

La nucleolina ha sido detectada en la matriz nucleolar de células animales por métodos inmunocitoquímicos (Spector y col. 1984b) y bioquímicos (Caizergues-Ferrer

1984). Nuestros resultados usando técnicas citoquímicas confirman su presencia en la matriz nucleolar de células vegetales, y evidencian la similitud de composición y funcionalidad de ambas estructuras.

Respecto a las fibras de la matriz nucleolar que no contienen nucleolina fosforilada no son directamente identificables con ninguno de los componentes del nucleolo "in situ".

Aunque parecen contener ribonucleoproteínas por su contraste con la tinción de EDTA, harían falta ensayos específicos con anticuerpos contra proteínas del esqueleto nucleolar para averiguar su composición y establecer una correlación con las estructuras correspondientes del nucleolo "in situ". En base a su estructura fina podrían corresponder a elementos esqueléticos del componente fibrilar denso no implicados en transcripción, o del componente granular.

De la misma forma que puede monitorizarse la aparición gradual de las estructuras matriciales en los sucesivos pasos de extracción, los componentes polipeptídicos de la matriz se detectan a lo largo del procedimiento extractivo como consecuencia de un enriquecimiento sucesivo en las fracciones residuales de bandas proteicas presentes en los núcleos y tras una eliminación gradual de los polipéptidos no matriciales.

TABLA XIV

EVOLUCION ESTRUCTURAL DEL NUCLEOLO DURANTE EL PROCESO EXTRACTIVO

ORGANIZACION ESTRUCTURAL

Núcleo aislado	centros fibrilares	componente fibrilar denso	componente granular
----------------	-----------------------	---------------------------------	------------------------

Extracción con Tx-100	centros fibrilares	componente fibrilar denso	componente granular
--------------------------	-----------------------	---------------------------------	------------------------

Digestión con nucleasas	centros fibrilares	Malla fibrilar	
----------------------------	-----------------------	----------------	--

Extracción en baja fuerza iónica	centros fibrilares	estructura fibrilar fuertemente compacta	
--	-----------------------	---	--

Extracción en alta fuerza	centros fibrilares	Malla fibrilar	
------------------------------	-----------------------	----------------	--

6.2. CORRESPONDENCIAS CITOQUIMICAS DE LOS COMPONENTES MATRICIALES EN RELACION AL NUCLEO AISLADO

Las tinciones citoquímicas de EDTA y Bismuto, al identificar componentes ribonucleoproteicos y proteínas fosforiladas respectivamente, nos permiten establecer unas relaciones matriz nuclear-núcleo que superan el marco de las analogías estructurales y posibilitan una interpretación funcional de la matriz nuclear.

COMPONENTES RIBONUCLEOPROTEICOS

Los resultados de la contrastación EDTA en los núcleos aislados concuerdan con el modelo general de tinción que presenta el núcleo de este mismo sistema "in situ" (Medina y col. 1989). La envuelta nuclear y las masas de cromatina condensada se blanquean y en las regiones intercromatínicas aparecen contrastados algunas fibras y los dos tipos de gránulos, asimismo el nucleolo se contrasta fuertemente excepto las áreas correspondientes a los centros fibrilares.

Las fibras de las regiones intercromatínicas de los núcleos aislados pueden interpretarse como productos de la transcripción no nucleolar (Puvion y Moyne 1981) aunque la reducción relativa de tamaño que experimentan estas regiones durante el aislamiento nuclear, hace difícil la distinción entre fibrillas peri e intercromatínicas. La contrastación preferencial de los gránulos de 25-30 nm junto con su reacción positiva con bismuto permite identificarlos con los G.I. observados "in situ" (Medina y col. 1989). También los gránulos de 40-45 nm aparecen reiteradamente contrastados mediante la tinción con EDTA tanto "in situ" (Medina y col 1989) como en los núcleos aislados, indicando que contienen algún tipo de ARN. La fuerte contrastación del nucleolo en su

conjunto excepto las áreas de los centros fibrilares, es compatible con la interpretación morfo-funcional de este orgánulo nuclear. El componente fibrilar denso se considera la expresión morfológica de la transcripción activa de los genes ribosómicos (Fakan y Puvion 1980), está bien documentado que el componente granular contiene preribosomas en diversos estados de maduración así como las subpartículas nucleolares correspondientes a la subunidad grande y pequeña del ribosoma (Hadjiolov 1985), y los centros fibrilares, que contienen cromatina inactiva pero preparada para transcribir y al menos parte de la maquinaria enzimática necesaria para la transcripción, no se consideran un lugar de iniciación de la misma (Martin 1990).

Mediante tinción EDTA se contrastan diferencialmente en la matriz nuclear interna los gránulos de 25 nm y otros de diámetro menor (10-15 nm) que están unidos entre sí por fibras matriciales. La organización estructural de estos últimos en polipartículas, sus dimensiones (10-15nm), y su tinción diferencial nos permiten relacionarlos con los complejos RNPs resistentes a sal que contienen ARNm en núcleoesqueletos obtenidos a partir de células HeLa S3 (Gallinaro y col.1983). Y su estructura de referencia "in situ" pueden ser las fibras de 4-7nm contrastadas por EDTA en las regiones intercromatínicas del núcleo aislado. Estos resultados son compatibles con la hipótesis de que también en sistemas vegetales la matriz nuclear contenga remanentes de productos de transcripción asociados, y que al menos parte de las abundantes fibrillas no realizadas por la tinción podrían constituir un soporte esquelético nuclear.

El contraste de las fibras de la matriz nucleolar se explicaría por la presencia de ARN U3 y ARNpre-r residuales asociados a los componentes esqueléticos de la matriz nucleolar (Parker y Steitz 1987, Ciejek y col. 1982), aunque tampoco puede excluirse la presencia de un ARN residual fuertemente protegido y con funciones estructurales.

PROTEINAS FOSFORILADAS

Los resultados de la tinción con bismuto nos permiten correlacionar los gránulos de 25-30 nm de la matriz nuclear con los G.I. del núcleo "in situ" (Medina y col. 1989) y concluir que las polipartículas de RNP no parecen estar relacionadas con ellos ya que no contienen proteínas altamente fosforiladas que son un componente característico de los mismos.

La porción de la matriz nucleolar correspondiente al componente fibrilar denso del nucleolo es identificable por la presencia de nucleolina altamente fosforilada. La asociación de esta proteína con la matriz nucleolar indica que este componente matricial estaría implicado en la transcripción de los genes de ADNr, igual que sucede en sistemas animales (Ross y col. 1982, Ciejek y col. 1982, Abufalia y col. 1984).

El análisis de la ultraestructura y composición polipeptídica de las diferentes fracciones residuales, así como los resultados de las tinciones citoquímicas para ribonucleoproteínas y proteínas altamente fosforiladas sugieren que la matriz nuclear en *Allium cepa* no es un artefacto generado durante el procedimiento de extracción, sino que existe una estructura nuclear subyacente que empieza a ser revelada después de las digestiones enzimáticas. Deriva de elementos residuales de la envuelta nuclear, de las regiones intercromatínicas y está relacionada con los centros fibrilares y el componente fibrilar denso del nucleolo. El procedimiento de fijación con glutaraldehído o paraformaldehído puede estabilizar sus componentes, pero muy probablemente estos derivan de estructuras pre-existentes en el núcleo "in situ".

La interpretación global de nuestros resultados nos conduce a proponer un modelo de matriz nuclear en sistemas vegetales muy semejante al de sistemas animales. Pues a pesar de la mayor estabilidad que presentan sus elementos internos, la matriz nuclear de *Allium cepa* es análoga a la de sistemas animales, en su morfología de conjunto, en la ultraestructura de cada uno de sus componentes, en la presencia de G.I., en la organización de dominios de cromatina y dominios ribonucleoproteicos y en la asociación de una proteína nucleolar implicada en los principales eventos de la transcripción y procesamiento de los genes ribosómicos. Su composición polipeptídica sin embargo se asemeja más a la de eucariotas inferiores.

CONCLUSIONES

- 1°. Los métodos de extracción utilizados para la preparación de las matrices han mostrado ser eficientes en la eliminación de ADN y ARN del núcleo, como demuestra la doble fluorescencia con DAPI y PIRONINA; altamente repetitivos y no producen distorsiones apreciables en la organización estructural de las matrices.
- 2°. El método de doble fluorescencia con DAPI y PIRONINA en las condiciones que hemos puesto a punto, constituye un buen control de la eliminación de ácidos nucleicos durante la preparación de las matrices, ya que es sencillo, rápido y fiable, y se puede efectuar con muestras muy pequeñas de preparación. Sin embargo, no permite la detección de los ácidos nucleicos residuales de la matriz ya que su concentración es menor que el umbral de sensibilidad de la técnica.
- 3°. La matriz nuclear de *Allium cepa* es estable frente a procedimientos de extracción que en otros sistemas celulares inducen desorganizaciones de los elementos internos. Todos sus elementos son al menos parcialmente resistentes a la digestión con RNasa, y no dependen de la formación de puentes disulfuro aleatorios entre proteínas durante la extracción. Sin embargo, parecen sensibles a la concentración de cationes divalentes.
- 4°. Cualquiera que sea el procedimiento de extracción utilizado, la matriz nuclear presenta una organización estructural bien definida y reproducible; formada por el complejo lámina-poros, el nucleolo residual y la matriz interna. Las características estructurales de cada uno de ellos son análogas a las de sistemas animales y eucariotas inferiores.
- 5°. La reconstrucción tridimensional con ordenador de los cortes seriados de matrices

nucleares, nos ha permitido comprobar la organización espacial ordenada y la alta conservación de la distribución intranuclear de la matriz interna y nucleolar, demostrando asimismo que existe una continuidad física entre sus componentes, lo que sugiere la existencia de una estructura nucleoesquelética subyacente.

6*. El complejo lámina-poros deriva de los elementos esqueléticos de la envuelta nuclear y es el dominio más estable de la matriz.

7*. La matriz interna deriva principalmente de estructuras intercromatínicas del núcleo "in situ". Es moderadamente sensible a la digestión con RNasa y a la extracción en condiciones reducidas, y está constituida por dos mallas con diferente organización estructural y composición química. Una de ellas parece ser exclusivamente fibrilar y proteínica, mientras que la otra es fibrillogranular y contiene polipartículas de ribonucleoproteínas.

8*. Los gránulos intercromatínicos forman parte de la matriz interna.

9*. La matriz nucleolar es de estructura fibrilar y composición heterogénea, ya que parte de sus fibras contienen proteínas altamente fosforiladas. Los centros fibrilares son un componente de la matriz muy estable frente a las variaciones del método de extracción. La reacción con bismuto nos permite concluir que la proteína análoga a la nucleolina de plantas es un componente de la matriz nucleolar y localizar esta proteína en las zonas que rodean a los centros fibrilares.

10*. Los ácidos nucleicos residuales de la matriz nuclear han sido detectados

eficazmente mediante un anticuerpo monoclonal contra ADN y la tinción preferencial para ribonucleoproteínas de EDTA. Tanto el ADNnm como las RNPs aparecen mayoritariamente asociados con los elementos internos de la matriz: matriz interna y nucleolar.

11^a. La composición polipeptídica de las matrices es compleja con numerosas bandas entre 70 y 12 KD de peso molecular y presenta abundantes componentes de bajo Pm típicos de las matrices de eucariotas inferiores. El modelo polipeptídico de las matrices varía de acuerdo con el procedimiento de extracción utilizado, siendo el método clásico de Berezney y Coffey y su variante con la digestión de RNasa previa a la extracción con 2M ClNa los más extractivos. Existe un grupo de proteínas en el rango 63-50 KD que son componentes constantes de todas las matrices independientemente del método de extracción utilizado y que constituirían las proteínas estructurales básicas de la matriz en *Allium cepa*.

12^a. Resumiendo todos estos datos, nuestros resultados confirman la existencia de una matriz nuclear en células vegetales homologable desde el punto de vista estructural, de composición y funcional a la descrita en mamíferos, aves, anfibios, moluscos e insectos; aunque con ciertas características de las matrices de eucariotas inferiores, apoyando la hipótesis de la universalidad de esta estructura en células eucarióticas, y confirmando la conservación evolutiva de las estructuras implicadas en los procesos básicos de funcionalidad nuclear en células eucarióticas.

BIBLIOGRAFIA

- 1-AARONSON, R.P., BLOBEL, G. (1974). On the attachment of the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* 62:746-754
- 2-AARONSON, R.P., BLOBEL, G. (1975). Isolation of nuclear pore complexes in association with a lamina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72: 1007-1001.
- 3-ABULAFIA, R., BEN-ZE'EV, A., HAY, N., ALONI, Y. (1984). Control of late SV40 transcription by the attenuation mechanism and transcriptionally active ternary complexes are associated with the nuclear matrix. *J. Molec. Biol.* 172: 467-487.
- 4-ADOLPH, K.W. (1980). Organisation of chromosomes in HeLa cells: Isolation of histone-depleted nuclei and nuclear scaffolds. *J. Cell Sci.* 42 : 291-304.
- 5-AEBI, V., COHN, J., BUHLE, L., GERACE, L. (1986). The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. *Nature.* 323: 560-564.
- 6-AGUTTER, P.S. (1988). Nucleocytoplasmic transport of mRNA: Its relationship to RNA metabolism, subcellular structures and other nucleocytoplasmic exchanges. *Progr. Molec. Subcell. Biol.* 10: 15-96.
- 7-AGUTTER, P.S., BIRCHALL, K. (1979). Functional differences between mammalian nuclear matrix and pore-lamin preparations. *Exp. Cell Res.* 124: 453-460.
- 8-AGUTTER, P.S., RICHARDSON, J. (1980). Nuclear non-chromatin proteinaceous structures: their role in the organization and function of the interphase nucleus. *J. Cell Sci.* 44: 395-435.
- 9-AGUTTER, P.S., THOMPSON, J. (1989) Nucleocytoplasmic mRNA transport: Its status in current subcellular Biology. In: Membrane structure and function. vol.6. pp43-98. BITTAR, E.E. (ed), Wiley, New York.
- 10-ALIGUE, R., BASTOS, R., SERRATOSA, J., ENRICH, C., JAMES, P., PUJADES, C., BACHS, O. (1990). Increase in a 55 KDa Keratin-like protein in the nuclear matrix of rat liver cells during proliferative activation. *Exptl. Cell Res.* 186: 346-353.
- 11-AMATI, B., GASSER, S.M. (1988). Chromosomal ars and CEN elements bind specifically to the yeast nuclear scaffold. *Cell.* 54: 967-978.
- 12-ANDERSON, N.G. (1953). Studies on isolated cell components. The effects of nucleases and proteases on rat liver nuclei. *Exp. Cell Res.* 5: 361-374.
- 13-ARENSTORF, H.P., CONWAY G.C., WOOLEY J.C., Le STOURGEON W.M. (1984). Nuclear matrix-like filaments form through artefactual rearrangements of hnRNP particles. *J. Cell. Biol.* 99: 233a.
- 14-BACHMANN, M., BERND, A., SCHRÖDER, H.C., ZAHN, R.K., MUELLER, W. (1984). The role of protein phosphokinase and protein phosphatase during the nuclear envelope NTPase reaction. *Biochim. Biophys. acta.* 773: 308-316.
- 15-BAG, J. (1984). Cytoplasmic mRNA-protein complexes of chicken muscle cells and their role in protein synthesis. *Eur. J. Biochem.* 141: 247-254.
- 16-BARRACK, E.R., COFFEY, D.S. (1982). Biological properties of the nuclear matrix steroid hormone binding. *Rec. Prog. Hormone. Res.* 38: 133-195.

- 17-BARTHELEMY,I. (1984). Alslamiento y caracterización ultraestructural de la matriz nuclear en *Allium cepa* (L). Tesina de licenciatura. Universidad Complutense de Madrid.
- 18-BARTHELEMY,I., MORENO DIAZ DE LA ESPINA,S. (1984). Preliminary studies on the plant nuclear matrix ultrastructure. *Clenc. Biol.* 9: 138-139.
- 19-BEKERS,G.M., PIECK,A.C.M., RIJKEN,A.A.M., WANKA,E. (1986). Evidence for the persistence of a decondensed chromosome scaffold in the interphase nucleus. *J.Cell Sci.* 86: 155-171.
- 20-BENAVENTE,R., KROHNE,G. (1985). Change of Karyoskeleton during spermatogenesis of *Xenopus*: Expression of lamin LIV, a nuclear lamina protein specific for the male germ line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 6176-6180.
- 21-BENAVENTE,R., KROHNE,E., FRANKE,W.W. (1985). Cell type-specific expression of nuclear lamina proteins during development of *Xenopus laevis*. *Cell.* 41: 177-190.
- 22-BENAVENTE,R., KROHNE,G., STICK,R., FRANKE,W.W.(1984). Electronmicroscopic immunolocalization of a karyoskeletal protein of molecular weight 145.000 innucleoli and perinucleolar bodies of *Xenopus laevis*. *Expl. Cell Res.* 151: 224-235.
- 23-BENYAJATI,C., WORCELL,A. (1976). Isolation, characterization and structure of the folded interphase genome of *Drosophila Melanogaster*. *Cell.* 9: 393-407.
- 24-BEREZNEY,R. (1979). Dynamic Properties of the nuclear matrix. In: *The Cell Nucleus*.vol VII. pp413-454 (ed) Academic Press, Inc.
- 25-BEREZNEY,R. (1984). Organization and functions of the nuclear matrix. In: *Chromosomal Nonhistone Proteins*.vol IV.pp120-178 L.S., Hnilica (ed) CRC Press,Boca Raton.
- 26-BEREZNEY,R., COFFEY,D.S. (1973). Isolation of a nuclear structure complex from mammalian nuclei.*J.Cell Biol.* 59. Part 2: 22a
- 27-BEREZNEY,R., COFFEY,D.S. (1974). Identification of a nuclear protein matrix. *Biochem. Biophys. res. commun.* 60: 1410-1417.
- 28-BEREZNEY,R., COFFEY,D.S. (1975). Nuclear protein matrix: Association with newly synthesized DNA. *Science.* 189: 291-293.
- 29-BEREZNEY,R., COFFEY,D.S. (1976). The nuclear protein matrix: Isolation, structure and functions. *Adv. Enzyme Reg.* 14: 63-100.
- 30-BEREZNEY,R., COFFEY,D.S. (1977). Nuclear matrix: Isolation and characterization of a framework structure from rat liver nuclei. *J. Cell Biol.* 73: 616-637.
- 31-BEREZNEY,R., NAKAYASU,H., HAKES,D.J., BELGRADER,D., STEIN,S. (1989). In: 11th Nuclear Workshop. Program and Abstracts. pp 58.
- 32-BERNHARD,W. (1969). A new staining procedure for electronmicroscopical cytology. *J. Ultrastruct. Res.* 27: 250-265.

- 33-BERRIOS,M., OSHEROFF,N., FISHER,P.A. (1985). In situ localization of DNA topoisomerase II, a major polypeptide component of the *Drosophila* nuclear matrix fraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 4142-4146.
- 34-BERRIOS,M., FILSON,A.J., BLOBEL,G., FISHER,P.A. (1983). A 174-KD ATPase/dATPase polypeptide and a glycoprotein of apparently identical molecular weight are common but distinct components of higher eukaryotic nuclear structural protein subfractions. *J. Biol. Chem.* 258: 13384-13390.
- 35-BIGGIOGERA,M., FAKAN,S., SCOTT,H., KAUFFMANN,S.H., BLACK,A., SHAPER,J., HARRIS,B. (1989). Simultaneous immunoelectron microscopic visualization of protein B23 y C23. Distribution in the HeLa cell nucleolus. *J. Histochem. Cytochem.* 37: 1371- 1374.
- 36-BODNAR,J., JONES,C., COOMBS,D., PEARSON,G., WARD,D. (1983). Proteins tightly bound to HeLa cell DNA at nuclear matrix attachment sites. *Molec. Cel. Biol.* pp1567-1579.
- 37-BOLLA,R.I., BRAATEN,D.C., SHIOMI,Y., HEBERT,B., SCHLESSINGER,D. (1985). Localization of specific rDNA spacer sequences to the mouse L-cell nucleolar matrix. *Mol. and Cell. Biol.*5: 1287-1294
- 38-BONNEAU,A-M., DARVEAU,A., SONENBERG,N. (1985). Effect of viral infection on host protein synthesis and mRNA association with the cytoplasmic CSK structure. *J. Cell Biol.* 100: 1209- 1218.
- 39-BOUCHE,G.,CAIZERGUES-FERRER,M.,BUGLER,B.,AMALRIC,F.(1984).Interrelations between the maturation of a 100 KDa nucleolar protein and pre-r RNA synthesis in CHO cells. *Nucleic Acids Res.* 12: 3025-3035
- 40-BOURBON,H.M., BUGLER,B., CAIZERGUES-FERRER,M., AMALRIC,F. (1983 a). Maturation of a 100 KD protein associated with preribosomes in chinese Hamster ovary cell. *Mol. Biol. Rep.* 9: 39-47.
- 41-BOURBON,H., BUGLER,B., CAIZERGUES-FERRER,M., AMALRIC,F. (1983 b). Role of phosphorylation on the maturation pathways of 100 KD nucleolar protein. *FEBS Letters* 155: 218- 222.
- 42-BOURGEOIS,C.A., BOUVIER,D., SEVE,A.P., HUBERT,J. (1987). Evidendence for the existence of a nucleolar skeleton attached to the pore complex-lamina in human fibroblasts. *Chromosoma.* 95: 315-323.
- 43-BOUTEILLE,M., BOUVIER,D., SEVE,A.P. (1983). Heterogeneity and territorial organization of the nuclear matrix and related structures. *Int. Rev. Cytol.* 83: 135-181.
- 44-BOUVIER,D., HUBERT,J., BOUTEILLE,M. (1980 a). The nuclear shell in HeLa Cell Nuclei: Whole-mount electron microscopy of the dissocated and isolated nuclear periphery. *J. Ultras. Res.* 73: 288-298.
- 45-BOUVIER,D., DUPUY-COIN,A.M., BOUTEILLE,M., MOENS,S.P. (1980). Three-dimensional electron microscopy of the nuclear matrix components of HeLa cells. *Biol. Cell.* 39: 121-124.

- 46-BOUVIER,D., HUBERT,J., SEVE,A.P., BOUTEILLE,M. (1982). RNA is responsible for the three-dimensional organization of nuclear matrix proteins in HeLa cells. *Biol. Cell.* 43: 143-146.
- 47-BOUVIER,D., HUBERT,J., SEVE,A.P., BOUTEILLE,M.(1985). Nuclear RNA-associated proteins and their relationship to the nuclear matrix and related structures in HeLa cells. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 63: 631-643.
- 48-BOUVIER,D., HUBERT,J., SEVE,A.P., BOUTEILLE,M., MOENS,S.P.(1984). Three-dimensional approaches to the residual structure of histone-depleted HeLa cell nuclei. *J. Ultrastruct. Res.* 87: 112-123.
- 49-BRODIE,D.A., HUIE,P., LOCKE,M., OTTENSMEYER,F.P. (1982). The correlation between bismuth and uranyl staining and phosphorous content of intracellular structures and determined by electron spectroscopic imaging. *Tissue and Cell.* 10: 365-388.
- 50-BROWN,G.L., LOCKE,M. (1978). Nucleoprotein localization by bismuth staining. *Tissue and Cell.* 10: 365-388.
- 51-BUGLER,B., CAIZERGUES-FERRER,M., BOUCHE,G., BOURBON,H., AMALRIC,F. (1982). Detection and localization of a class of proteins immunologically related to a 100 KD nucleolar protein. *Eur. J. Biochem.* 128: 475-480.
- 52-BURDON,R.H., QRESHI,M., ADAMS,R.L.P. (1985).Nuclear matrix associated DNA methylase. *Biochim. Biophys. Acta.* 825: 70-79.
- 53-BUREAU,J., HUBERT,J., BOUTEILLE,M. (1986). Attachment of DNA to nucleolar and nuclear skeletal structures as visualized by KLEINSCHMIDT molecular spreading. *Biol. Cell.* 56: 7-16.
- 54-BURKE,B., GERACE,L. (1986). A cell free system to study reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis. *Cell.* 44: 639-652.
- 55-BURKHOLDER,G. (1983). Silver staining of histone-depleted metaphase chromosomes. *Exp. Cell Res.* 147: 287-296.
- 56-CAIZERGUES-FERRER,M., BELENGUER,P., LAPEYRE,B., AMALRIC,F., WALLACE,M.O. (1987). Phosphorylation of nucleolin by a nuclear type N II protein Kinase. *Biochemistry.* 26:7876-7883.
- 57-CAIZERGUES-FERRER,M.,DOUSSEAU,F.,GAS,N.,BOUCHE,G.,STEVENS,B.,AMALRIC,F (1984). Induction of new proteins in the nuclear matrix of CHO cells by a heat shock: detection of a specific set in the nucleolar matrix. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 118: 444-450.
- 58-CALVET,J.P., PEDERSON,T. (1977).Secondary structure of heterogeneous nuclear RNA: Two classes of doubled-stranded RNA in native ribonucleoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*74: 3705-3709.
- 59-CALVET,J.P., PEDERSON,T. (1979a). Photochemical cross-linking of secondary structure in HeLa cell heterogeneous nuclear RNA in situ. *Nucleic Acids Res.* 6: 1993-2001.
- 60-CALVET,J.P., PEDERSON,T. (1979b). Heterogeneous nuclear RNA doubled-stranded

regions probed in living HeLa cells by cross-linking with the psoralen derivative aminomethyl-trioxsalen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 755-759.

- 61-CAPCO,D.G., WAN,K.M., PENMAN,S. (1982). The nuclear matrix: Three-dimensional architecture and protein composition. *Cell.* 29: 847-858.
- 62-CAPCO,D.G., KROCHMALNIC,G., PENMAM,S. (1984). A new method of preparing embedment-free sections for transmission electron microscopy: applications to the cytoskeletal framework and other three-dimensional networks. *J. Cell Biol.* 98:1878-1885.
- 63-CARMO-FONSECA,M., CIDADAO,O., FERREIRA,D. (1987). Filamentous cross-bridges link intermediates filaments to the nuclear pore complexes. *Eur. J. Cell Biol.* 45: 282-290.
- 64-CARMO-FONSECA,M., PFEIFER,K., SCHRÖDER,H.C., VAZ,F.M., FONSECA,J.E., MÜLLER,W.E.G., BACHMANN. (1989). Identification of La ribonucleoproteins as a component of interchromatin granules. *Exp. Cell Res.* 185:73-85.
- 65-CEREZUELA M.A., MORENO DIAZ DE LA ESPINA (1990). Plant nuclear matrix effects of different extraction procedures on its structural organization and chemical composition. In: *Nuclear structures and function* .pp317-322. HARRIS,J,R, (ed) Plenum.London,NewYork.
- 66-CIEJECK,E.M., NORDSTROM,J.L., TSAI,M-J., O'MALLEY,B.W. (1982). Ribonucleic Acid Precursors are associated with the chick oviduct nuclear matrix. *Biochemistry.* 21: 4945-4953.
- 67-CIEJECK,E.M., TSAI,M.J., O'MALLEY,B.W. (1983). Actively transcribed genes are associated with the nuclear matrix. *Nature.* 306: 607-609.
- 68-CLARK,T.G., ROSENBAUM,J.L. (1979). An actin filament matrix in hand-isolated nuclei of *Xenopus laevis* oocytes. *Cell.* 18: 1101-1108.
- 69-CLAWSON,G.A., WOO,C.H., BUTTON,J., SMOCKER,E.A. (1984). Photoaffinity labelling of the major nucleoside triphosphatase of rat liver nuclear envelope. *Biochemistry.* 23: 3501-3507.
- 70-CLEVINGER,C.V., EPSTEIN,A.L. (1984). Identification of a nuclear protein component of interchromatin granules using a monoclonal antibody and immunogold electron microscopy. *Exp. Cell Res.* 151: 194-207.
- 71-COBBS,C.S., SHELTON,K.R. (1978). Major oligomeric structural proteins of the HeLa nucleus. *Arch. Biochem. Biophys.* 189:323-335.
- 72-COCKERILL,P.N., GARRAD,W.T. (1986). Chromosomal loop anchorage of Kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites. *Cell.* 44: 273-282.
- 73-COMERFORD,S.A., Mc LUCKIE,I.F., GORMAN,M., SCOTT,K.A., AGUTTER,P.S. (1985). The isolation of nuclear envelopes. Effects of thiol-group oxidation and of calcium ions. *Biochem. J.* 226: 95-103.
- 74-COMERFORD,S.A., AGUTTER,P.S., Mc LENNAN,A.G. (1986). Isolation of nuclear matrices. In: *Nuclear structures: Isolation and characterization* (Birnie,G.D.

and Mac Gillivray, A.J. eds), pp 1-13. Butterworth, London.

- 75-COMINGS,D.E., OKADA,T.A. (1976). Nuclear proteins: III. The fibrillar nature of the nuclear matrix. *Exp. Cell Res.* 103: 341-360.
- 76-COMINGS,D.E., PETERS,K.E. (1981). Two-dimensional gelelectrophoresis of nuclear particles. In: *The Cell Nucleus*. vol 9. pp 89-118. Busch,H.(ed). New York. Academic Press.
- 77-COOK,P.R., BRAZELL,I.A. (1976). Conformational constraints in nuclear DNA. *J.Cell Sci.* 22: 287-302.
- 78-COOK,P.R., BRAZELL,I.A., JOST,E. (1976). Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *J.CELL Sci.* 22: 303-324.
- 79-COWDEN,R.R., CURTIS,S.K. (1983). Supravital experiments with pyronin Y, a fluorochrome of mitochondria and nucleic acids. *Histochemistry*. 77:535-542.
- 80-COX,J., SCHEN,K.E., OLENSTED,J.B. (1983). Human antacentromere antibodies: Distribution, characterization of antigens, an effect on microtubule organization. *Cell*. 35: 331-339.
- 81-CHALY,N., BLADON,T., SETTERFIELD,G., LITTLE,J., KAPLAN,J.G., BROWN,D.L. (1984). Changes in distribution of nuclear matrix antigens during the mitotic cell cycle. *J. Cell Biol.* 99: 661-671.
- 82-CHIMERA,J.A., MUSICH,P.R. (1985). The association of the interspersed repetitive Kpn 1 sequences with the nuclear matrix. *J. Biol. Chem.* 260: 9373-9379.
- 83-CRISSMAN,H.A., STINKAMP,J.A. (1973). Rapid, simultaneous measurement of DNA, protein and cell volume in single cells from large mammalian cell populations. *J.Cell Biol.* 59: 766-771.
- 84-CRISSMAN,H.A., TOBEY,R.A. (1974). Cell cycle analysis in 20 minutes. *Science*. 184: 1297-1298.
- 85-DARZYNKIEWICZ,Z., KAPUCINSKI,Y., TRAGANOS,F., CRISSMAN,M.A. (1987). Application of pyronin Y (G) in cytochemistry of nucleic acids. *Cytometry*. 8: 138:145.
- 86-DAVIS,L.I., BLOBEL,G. (1986). Identification and characterization of a nuclear pore complex protein. *Cell*. 45: 699-709.
- 87-DIJKWEL,P.A., WENINK,P.W. (1986). Structural integrity of the nuclear matrix: Differential effects of thiol agents and metal chelators. *J. Cell Sci.* 84: 53-67.
- 88-DU PRAW,E.J. (1956). The organization of nuclei and chromosomes in honey bee embryonic cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 53: 161-168.
- 89-DWYER,N., BLOBEL,G. (1976). A modified procedure for the isolation of a pore complex-lamina fraction from rat liver nuclei. *J. Cell Biol.* 70: 581-591.
- 90-EARNSHAW,W.C., LAEMMLI,V.K. (1983). Architecture of metaphase chromosomes and chromosomes scaffolds. *J. Cell Biol.* 96: 84-93.

- 91-EARNSHAW,W.C., HALLIGAN,N., COOK,E.C., ROTHFIELD,N. (1984). The kinetochore is part of the metaphase chromosome scaffold. *J. Cell Biol.* 98: 352-357.
- 92-EARNSHAW,W.C., HALLIGAN,N., COOK,E.C., MECK,M., LERO,J.F., LI,U. (1985). Topoisomerase II is a structural component of mitotic chromosome scaffolds. *J. Cell. Biol.* 100: 1706-1715.
- 93-EGLY,J.M., MIYAMOTO,N.G., MONCOLLIN,U., CHAMBON,P. (1984). Is actin a transcription initiation factor for RNA polymerase B?. *EMBO. J.* 3: 2363-2371.
- 94-ERARD,M.S., BELENGER,P., CAIZERGUES-FERRER,M., PANTALONI,A., AMALRIC, F. (1988). A major nucleolar protein, nucleolin includes chromatin decondensation by binding to histone H1. *Eur. J. Biochem.* 175: 525-530.
- 95-ESCANDE,M.L., GAS,N., STEVENS,B.J. (1985). Immunolocalization of the 100 KD nuclear protein in CHO cells. *Biol. Cell.* 53: 99-110.
- 96-FAIFERMAN,I., POGO,O.A. (1975). Isolation of a nuclear ribonucleoprotein network that contains heterogeneous RNA and is bound to the nuclear envelope. *Biochemistry.* 14: 3808-3816.
- 97-FAKAN,S., BERNHARD,W. (1971). Localization of rapidly and slowly labeled nuclear RNA as visualized by high resolution autoradiography. *Exptl. Cell Res.* 67: 129-141.
- 98-FAKAN,S., HERNANDEZ-VERDUN,D. (1986). The nucleolus and the nucleolar organizer regions. *Biol. Cell.* 56: 189-206.
- 99-FAKAN,S., PUVION,E. (1980). Ultrastructural visualization of nuclear organizer activity during early germination of *Zea Mays*. *Int. Rev. Cytol.* 65: 255-299.
- 100-FAKAN,S., LESER,G., MARTIN,T.E. (1984). Ultrastructural distribution of nuclear ribonucleoproteins as visualized by immunocytochemistry on thin sections. *J. Cell Biol.* 98: 358-363.
- 101-FAKAN,S., PUVION,E., SPOHR,G. (1976). Localization and characterization of RNA structures. In: *The Cell Nucleus*, (Busch,H. ed.). Academic Press. New York. 8: 59-115.
- 102-FERNANDEZ-GOMEZ,M.E., MORENO DIAZ DE LA ESPINA,S., MEDINA,M.A., CEREZUELA, M.A. (1990). Bismuth oxynitrate staining as a tool for the localization of phosphorylated nucleoproteins in plants. *Actas XXV reuniao annual da S.P.M.E. Portugal.* 57-58.
- 103-FEUERSTEIN,N., SPIEGEL,S., MOND,J. (1988). The nuclear matrix protein numatrina (B23), is associated with growth factor. *J. Cell Biol.* 107: 1629-1642.
- 104-FEY,E.G., KROCHMALNIC,G., PENMAN,S. (1986). The nonchromatin substructures of the nucleus: The ribonucleoprotein (RNP)-containing and RNP-depleted matrices analyzed by sequential fractionation and resinless section electron microscopy. *J. Cell Biol.* 102: 1654-1665.
- 105-FISHER,D.Z., CHAVDHARY,N., BLOBEL,G. (1986). cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 6450-6454.

- 106-FOSTER,K.A., COLLINS,J.M. (1985). The interrelation between DNA synthesis rates and DNA polymerases bound to the nuclear matrix in synchronized HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 260: 4249-4235.
- 107-FRANKE,W.W., KLEINSCHMIDT,J.A., SPRING,H., KROHNE,G., GRUND,C., TRENDELEMBURG,M.F., STOEHR,M., SCHEER,V. (1981). A nucleolar skeleton of protein filaments demonstrated in amplified nucleoli of *X. laevis*. *J. Cell Biol.* 90: 289-299.
- 108-FRANKE,W.W. (1987). Nuclear lamins and cytoplasmic intermediate filament proteins: a growing multigene family. *Cell.* 48: 3-4.
- 109-GALLINARO,H., PUVION,E., KISTER,L., JACOB,M. (1983). Nuclear matrix and hnRNP share a common structural constituent associated with pre-mRNA. *EMBO J.* 2: 953-960.
- 110-GAS,N., INCHAUPE,G., AZUM,M.C, STEVENS,B. (1984). Bismuth staining of a nucleolar protein. *Exptl. Cell Res.* 151: 447-457.
- 111-GASSER,S.M., LAEMMLI,U.K. (1986). The organization of chromatin loops: characterization of a scaffold attachment site. *EMBO J.* 5: 511-518.
- 112-GEISLER,N., WEBER,K. (1982). The amino acid sequence of chicken muscle desmin provides a common structural model for intermediate filament proteins. *EMBO J.* 1: 1649.
- 113-GEISLER,N., KAUFFMAN,E., FISHER,S., PLESSMANN,U., WEBER,K. (1983). Neurofilament architecture combines structural principles of intermediate filaments with carboxy-terminal extensions increasing in size between triplet proteins. *EMBO J.* 2: 1295-1302.
- 114-GEORGATOS,S.D., BLOBEL,G. (1987). Lamin B constitutes and intermediate filament attachment site at the nuclear envelope. *J. Cell Biol.* 105: 117-125.
- 115-GEORGATOS,S.D., MAROULAKOU,I., BLOBEL,G. (1989). Lamin A, lamin B and lamin B receptor analogues in yeast. *J. Cell Biol.* 108: 2069-2082.
- 116-GEORGIEV,G.P., CHENTSOV,Y.S. (1960). On the structure of the cell nucleus. Experimental electron microscopic studies on isolated nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USSR.* 132: 199-201.
- 117-GERACE,L., BLOBEL,G. (1971). Nuclear lamina and the structural organization of the nuclear envelope. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol.* 46: 967-977.
- 118-GERACE,L., BLOBEL,G. (1980). The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerised during mitosis. *Cell.* 19: 277-280.
- 119-GERACE,L., BURKE,B. (1988). Functional organization of the nuclear envelope. *Ann. Rev. Cell Biol.* 4: 335-374.
- 120-GERACE,L., BLUM,A., BLOBEL,G. (1978). Immunocytochemical localization of the major polypeptides of the nuclear pore complex-lamina fraction. *J. Cell Biol.* 79: 546.

- 121-GERACE,L., OTTAVIANO,Y., KONDOR-KOCH,C. (1982). Identification of a mayor polypeptide of the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* 95: 826-837.
- 122-GHOSH,S., DEY,R. (1986). Nuclear matrix network in *Allium cepa*. *Chromosoma*. 93: 429-439.
- 123-GOODERMAN,K., JEPPESEN,P. (1983). Chinese hamster metaphase chromosomes isolated under physiological conditions. *Exp. Cell Res.* 144: 1-14.
- 124-GREBANIER,A.E., POGO,O.A. (1979). Cross-linking of proteins in nuclei and DNA-depleted nuclei from Friend erythroleukemia cells. *Cell*. 18: 1091-1099.
- 125-GREIMERS,R., DELTOUR,R. (1981). Organization of transcribed and non-transcribed chromatin in isolated nuclei of *Zea Mays* root cells. *Eur. J. Cell Biol.* 23: 303-311.
- 126-GROSSI de Ba,M.F., HARPER,F., GOUNON,P., PAL,J.K., OLEIK,M., Scheuer,K. (1987). The cytolocalization of prosomal proteins found in nuclei on chromosomes and the nuclear matrix, and on the intermediate filaments in the cytoplasm varies as a function of differentiation. Abstract of the 10th European Nuclear Workshop. p76.
- 127-GRUSS,P., LAI,C-J., DHAR,R., KHOURY,G. (1979). Splicing as a requirement for biogenesis of functional 16S mRNA of SV40. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 76: 4317-4321.
- 128-HABETS,W.J., BERDEN,J.H.M., HOCH,S.O., van VENROOIJ,W.J. (1985). Further characterization and subcellular localization of Sm and U1 ribonucleoprotein antigens. *Eur. Immunn.* 15:992-997.
- 129-HADJIOLOV,A.A. (1985).The nucleolus and ribosome biogenesis. *Cell Biology Monographs*. vol 12.(ALFERT,M., BEERMANN,W.,GOLDSTEIN,L., PORTER,K,R., SITTE,P.) (eds). Springer-Verlag. Wien New York.
- 130-HADLACKY,G., SUMMER,A.T., ROSS,A. (1981). Protein depleted chromosomes. II. Experiments concerning the reality of chromosome scaffold. *Chromosoma*. 81: 557-567.
- 131-HANCOCK,R., HUGHES,M.E. (1982). Organization of DNA in the interphase nucleus. *Biol. Cell*. 44: 201-212.
- 132-HARGREAVES,A.J., DAWSON,P.J., BUTCHER,G.W., LARKINS,A., GOODBODY,K.C., LLOYD,C. (1989). A monoclonal antibody raised against cytoplasmic fibrillar bundles from carrots cell, and its cross-reaction with animal intermediate filaments. *J. Cell Sci.* 92: 371-378.
- 133-HART,G.W. (1987). Nuclear pore complex glycoproteins contain cytoplasmic disposed O-linked N-acetylglucosamine. *J. Cell Biol.* 104: 1157-1164.
- 134-HE,D., NICKERSON,J.A., PENMAN,S. (1990). Core filaments of the nuclear matrix. *J. Cell Biol.* 110: 569-580.
- 135-HERLAND,G., WUNDERLICH,F. (1976). Isolation of a nuclear matrix from *Tetrahymena macronuclei*. *Cytobiol.* 13: 291-296.

- 136-HERLAND,G.,ECKERT,W.,KAFFEMBERGER,W.,WUNDERLICH.F.(1976).Isolation and characterization of an RNA-containing nuclear matrix from *Tetrahymena* macronuclei. *Biochem.* 18: 1782-1788.
- 137-HERRERA,A.H., OLSON,M.O.J. (1986). Association of protein C23 with rapidly labelled nucleolar RNA. *Biochemistry* 25: 6258-6264.
- 138-HÖGER,T.A., KROHNE,G., FRANKE,W.W. (1988). Aminoacid sequence and molecular characterization of murine lamina B as deduced from cDNA clones. *Eur. J. Cell Biol.* 47: 283-290.
- 139-HONDA,S.I., HONGLADAROM,T., LATIES,G.G. (1966). A new isolation medium for plant organelles. *J. Expl. Botany.* 52: 460-472.
- 140-HOLOUBECK,U. (1984). Nuclear ribonucleoproteins containing heterogeneous RNA. In: *Chromosomal non histone proteins. Vol IV.* 21-117. Structural associations. LS Hnilica ed.CRC Press.
- 141-HOLT,G.D., SNOW,C.M., HALTIWANGER,R.S., GERACE,L., HART,G.W. (1987). Nuclear pore complex glycoproteins contain cytoplasmically disposed o-linked N-acetyl glucosamine. *J. Cell Biol.* 104: 1157-1164.
- 142-HOWE,J.G., HERSHEY,J.W.B. (1984). Translational initiation factor and ribosome association with the cytoskeletal framework fraction from HeLa cells. *Cell.* 37: 85-93.
- 143-HÜGLE,B., SCHEER,V., FRANKE,W. (1985). Ribocharin: A nuclear Mr 40.000 protein specific to precursor particles of the large ribosomal subunit. *Cell.* 41: 615-627.
- 144-JACKSON,D.A., COOK,P.R. (1986). Replication occurs at a nucleoskeleton. *EMBO J.* 5: 1403-1410.
- 145-JACKSON,D.A., COOK,P.R. (1988). Visualization of a filamentous nucleoskeleton with a 23nm axial repeat. *EMBO J.* 7: 3667-3677.
- 146-JACKSON,D.A., COOK,P.R., PATEL,S.B. (1984). Attachment of repeated sequences to the nuclear cage. *Nucleic Acids. Res.* 17: 6709-6726.
- 147-JACKSON,D.A., Mc CREADY,S.J., COOK,P.R. (1981). RNA is synthesized at the nuclear cage. *Nature.* 292: 552-555.
- 148-JEFFERY,W.R. (1982). Messenger RNA in the cytoskeletal framework: analysis by in situ hybridization. *J. Cell Biol.* 95: 1-7.
- 149-JEPPESEN,P., MORTEN,H. (1985). Effects of sulphhydryl reagents on the structure of dehistonized metaphase chromosomes. *J. Cell Sci.* 73: 245-260.
- 150-JORDAN,E.G. (1984). Nucleolar nomenclature. *J. Cell Sci.* 67: 217-220.
- 151-JORDAN,E.G. (1987). At the heart of the nucleolus. *Nature.* 329: 489-490.
- 152-JOST,E., JHONSON,R.T. (1981). Nuclear lamina assembly, synthesis and disaggregation during the cell cycle in synchronized HeLa cells. *J. Cell Sci.* 47: 25-53.

- 153-JOST,E., LEPPER,K., HÖGNER,D., ZIMMER,A., BOSCHEK,B. (1986). Redistribution of nuclear lamins in mitotic cells. *Biol. Cell.* 57: 111-126.
- 154-KAUFFMANN,S.H., SHAPER,J.H.P. (1984). A subset of non-histone nuclear proteins reversibly stabilized by the sulphydryl cross-linking reagent tetrathionate. *Exptl. Cell Res.* 155: 477-495.
- 155-KAUFFMANN,S.H., COFFEY,D., SHAPER,J.H. (1981). Considerations in the isolation of rat liver nuclear matrix, nuclear envelope and pore complex lamina. *Exptl. Cell Res.* 132: 105-123.
- 156-KIRSCH,T.M., MILLER-DIENER,A., LITWAK,G. (1986). The nuclear matrix is the site of glucocorticoid receptor complex action in the nucleus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137: 640-648.
- 157-KROHNE,G., BENAVENTE,R. (1986). The nuclear lamins. A multigene family of proteins in evolution and differentiation. *Exptl. Cell Res.* 162: 1-10.
- 158-KROHNE,G., DABAUVALLE,M.C., FRANKE,W.W. (1981). Cell type-specific differences in protein composition of nuclear pore complex-lamina structures in oocytes and erythrocytes of *Xenopus laevis*. *J. Mol. Biol.* 151: 121.
- 159-KROHNE,G., DEBUS,E., OSBORN,M., WELH,K., FRANKE,W.W. (1984). A monoclonal antibody against nuclear lamina proteins reveals cell type-specificity in *X.laevis*. *Exptl. Cell Res.* 150: 47-59.
- 160-KROHNE,G., WOLIN,S.L., Mc KEON,F.D., FRANKE,W.W., KIRSCHNER, M.W. (1987). Nuclear lamin L1 of *X. laevis* : cDNA cloning, amino acid sequence and binding specificity of a member of the lamin B subfamily. *EMBO J.* 6: 3801-3808.
- 161-KROHNE,G., STICK,R., KLEINSCHMIDT,J.A., MOLL,R., FRANKE,W.W., HAUSEN, P.(1982). Immunological localization of a major karyoskeletal protein in nucleoli of oocytes and somatic cells of *X. laevis*. *J. Cell Biol.* 94: 749-754.
- 162-KRYZOWSKA-GRUCA,S., ZBOREK,A., GRUCA,S. (1983). Distribution of interchromatin granules in nuclear matrices obtained from nuclei exhibiting different degree of chromatin condensation. *Cell Tissue Res.* 231: 427-437.
- 163-KUEHL,L. (1964). Isolation of plant nuclei. *Z. Natur. Forschg.* 19b: 525-532.
- 164-KUZMINA,S., BULDYAEVA,T., TROITSKAIA,L., ZBARSKY,I.B. (1981). Characterization and fractionation of rat liver nuclear matrix. *Eur. J. Cell Biol.* 25: 225-232.
- 165-LAEMMLI,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- 166-LAFOND,R.E., WOODCOCK,C.L.F. (1983). Status of the nuclear matrix in mature and embryonic chick erythrocyte nuclei. *Exptl. Cell Res.* 147: 31-39.
- 167-LAPEYRE,B., AMALRIC,F. (1986). Protein and cDNA sequence of a glycine-rich, dimethylarginine contain region coated near the carboxyl-terminal end of nucleoline (C23 and 100 KDa). *J. Biol. Chem.* 261: 9167-9173.
- 168-LAPEYRE,B., BOURBON,H., AMALRIC,F. (1987). Nucleolin, the major nucleolar

- protein of growing eucaryotic cells: an unusual protein structure revealed by the nucleotide sequence. *Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.)*. 84: 1472-1476.
- 169-LAU, Y.F., ARRIGUI, F.E. (1981). Studies of mammalian chromosome replication. II. Evidence for the existence of defined chromosome replicating units. *Chromosoma*. 83: 721-741.
- 170-LAZARIDES, E. (1980). Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature*. 283: 249-256.
- 171-LEBEL, S., RAYMOND, Y. (1987). Lamins A, B and C share an epitope with the common domain of intermediate filament proteins. *Exptl. Cell Res.* 169: 560-565.
- 172-LEBKOWSKI, J.S., LAEMMLI, U.K. (1982). Evidence for two levels of DNA folding in histone-depleted HeLa interphase nuclei. *J. Mol. Biol.* 156: 309-324.
- 173-LEWIS, C.D., LAEMMLI, U.K. (1982). Higher order metaphase chromosome structure: Evidence for metaloprotein interactions. *Cell*. 29: 171-181.
- 174-LEWIS, C.D., LEBKOWSKI, Y.S., DALY, A.K., LAEMMLI, U.K. (1984). Interphase nuclear matrix and metaphase scaffolding structures. *J. Cell. Sci. Suppl* 1: 103-122.
- 175-LISCHWE, M.A., RICHARDS, R.L., BUSCH, H. (1981). Localization of phosphoprotein C23 to nucleolar structures and to the nucleolus organizer regions. *Exp. Cell Res.* 136: 101-109.
- 176-LLOYD, W.C. (1987). The plant cytoskeleton: The impact of fluorescence microscopy. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38: 119-139.
- 177-LOCKE, M., HUIE, P. (1975). The Golgi complex/endoplasmic reticulum transition region has rings of beads. *Science*. 188: 1219-1221.
- 178-LOCKE, M., HUIE, P. (1976). Nucleoprotein localization by bismuth staining. *Microscop. Soc. Canad.* 3: 96-97.
- 179-LOCKE, M., HUIE, P. (1977). Bismuth staining for light and electron microscopy. *Tissue and Cell*. 9: 347-371.
- 180-LONG, B.H., HUANG, C-Y., POGO, A.O. (1979). Isolation and characterization of the nuclear matrix in Friend erythroleukemia cells: Chromatin and hnRNA interactions with the nuclear matrix. *Cell*. 18: 1079-1090.
- 181-LONG, B.H., OCHS, R.L. (1983). Nuclear matrix, hnRNA, and snRNA in Friend erythroleukemia nuclei depleted of chromatin by low ionic strength EDTA. *Biol. Cell*. 48: 89-98.
- 182-LONG, B.H., SCHRIER, W. (1983). Isolation from Friend erythroleukemia cells of an RNAase sensitive nuclear matrix fibril fraction containing hnRNA and snRNA. *Biol. Cell*. 48: 99-108.
- 183-LOTHSTEIN, L., ARENSTORF, H.P., CHUNG, S-Y., WALKER, B., WOOLEY, J.C., LE STOURGEON, W.W. (1985). General organization of protein in HeLa 40S nuclear ribonucleoprotein particles. *J. Cell Biol.* 100: 1570-1581.
- 184-LOURIM, D., LIM, J.-C. (1989). Expression of nuclear lamin A and muscle-specific

- proteins in differentiating muscle cells in ovo and in vitro. *Cell Biol.* 109: 495-504.
- 185-LOWRY,O.H., ROSEBROUG,N.J., LEWIS FARR,A., RANDAL,R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- 186-LUTZ,Y., JACOB,M., FUCHS,J.P. (1988). The distribution of two hnRNP-associated proteins defined by a monoclonal antibody is altered in heat-shocked HeLa Cells. *Exptl. Cell Res.* 175: 109-124.
- 187-Mc DONALD,J.R., AGUTTER,D.S. (1980).The relationship between polyribonucleotide binding and the phosphorylation and dephosphorylation of nuclear envelope protein. *FEBS LETT.* 116: 145-148.
- 188-Mc KEON,F.D.,TUFANELLI,D.L., FUKUYAMA,K., KIRSCHNER,M.W. (1983). Autoimmune response directed against conserved determinants of nuclear envelope proteins in a patient with linear scleroderma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 4374-4378.
- 189-Mc KEON,F.D., KIRSCHNER,M.W., CAPUT,D. (1986). Homologies on both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature.* 319: 463-468.
- 190-MARIMAN,E.C.M., van EEKELEN,C.A.G., REINDERS,R.J., BERNIS,A.J.M., van VENROOIJ,W. (1982). Adenoviral heterogenous nuclear RNA is associated with the host nuclear matrix during splicing. *J. Mol. Biol.* 154: 103-119.
- 191-MARTIN,M. (1990). Arquitectura molecular de la transcripción en el nucleolo de *Allium cepa*. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- 192-MARTIN,M., MORENO DIAZ de la ESPINA,S., MEDINA,F.J. (1989). Immunolocalization of DNA at nucleolar structural components in onion cells. *Chromosoma.* 98: 368-377.
- 193-MARTIN,T., BILLINGS,P., PULLMAN,J., STEVENS,B., KINNIBURG,A. (1978). Substructure of nuclear ribonucleoprotein complexes. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* 42: 899-909.
- 194-MAUL,G.G. (1977). The nuclear and the cytoplasmic pore complex: structure, dynamics, distribution and evolution. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 6: 75-183.
- 195-MAUL,G.G., BAGLIA,F.A., NEWMEYER,D.D., OHLSSONWILHELM,B.H. (1984). The mayor 67.000 Mr protein of the clam oocyte nuclear envelope is lamin-like. *J. Cell Sci.* 67: 69-85.
- 196-MAUNDRELL,K., MAXWELL,E.S., PUVION,E., SCHERRER,K. (1981). The nuclear matrix of duck erythroblasts is associated with globin mRNA transcripts but not with the mayor proteins of 40S nuclear RNP. *Exp. Cell Biol.* 88: 554-563.
- 197-MAYER,D.T., GULIK,A. (1942). The nature of the proteins of cellular nuclei. *J. Biol. Chem.* 146: 433-440.
- 198-MEDINA,M.A. (1987). Caracterización ultraestructural y citoquímica de los G.I. en el núcleo interfásico de plantas superiores. Tesina de licenciatura. Universidad Complutense de Madrid.

- 199-MEDINA,M.A., MORENO DIAZ de la ESPINA,S., MARTIN,M., FERNANDEZ GOMEZ,M.E. (1989). Interchromatin granules in plant nuclei. *Biol. Cell.* 67: 331-339.
- 200-MEDINA,F.J. (1988). Biología celular de la transcripción en células eucarióticas. En: *Oncología.* 11: 61-374.
- 201-MEDINA,F.J., RISUEÑO,M.A., MORENO DIAZ DE LA ESPINA,S. (1983). 3-D Reconstruction and morphometry of fibrillar centres in plant cells in relation to nucleolar activity. *Biol. Cell.* 48: 31-38.
- 202-MILAVETZ,B.I., EDWARDS,D.R. (1986). Synthesis and stability of nuclear matrix proteins in resting and serum-stimulated Swiss 3T3 cells. *J. Cell Physiol.* 127: 388-396.
- 203-MILLER,T.E., HUANG,CH-Y., POGO,O.A. (1978). Rat liver nuclear skeleton and ribonucleoprotein complexes containing hnRNA. *J. Cell Biol.* 76: 675-691.
- 204-MINGUEZ,A., MORENO DIAZ DE LA ESPINA,S., VAZQUEZ-NIN,G., ECHEVERRIA,O. (1990). Characterization of ribonucleoproteins in tomato nucleus by mild loosening and immunocytochemistry. *Actas XXV reuniao annual da S.P.M.E. PORTUGAL*,53-54.
- 205-MIRKOVITCH,J., MIRAULT,M-E., LAEMMLI,U.K. (1984). Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold. *Cell.* 39: 223-232.
- 206-MIRSKI,A.E., RISS,H. (1951). The composition and structure of isolated chromosomes. *J. Physiol.* 34: 475-492.
- 207-MITCHELSON,K.R., BEKERS,A.G.M., WANKA,F. (1979). Isolation of a residual protein structure from nuclei of the myxomycete *Physarum Polycephalum*. *J. Cell Sci.* 39: 247-256.
- 208-MONNERON,A., BERNHARD,W. (1969). Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *J. Ultrastruc. Res.* 27: 266-288.
- 209-MORENO DIAZ DE LA ESPINA,S., RISUEÑO,M.C. (1977). Fibrillar bodies in *Allium cepa*: an ultrastructural and cytochemical study. *Biol. Cell* 30: 93-112.
- 210-MORENO DIAZ DE LA ESPINA,S., BARTHELEMY,I., CEREZUELA,M.A. (1990a). Isolation and ultrastructural characterization of the residual matrix in a plant cell system. *Chromosoma* 99.
- 211-MORENO DIAZ DE LA ESPINA,S., CEREZUELA,M.A., MINGUEZ,A. (1990 b). Ultrastructural organization and main components of the plant nuclear matrix. *Actas XXV reuniao anual da S.P.M.E. PORTUGAL*, 55-56.
- 212-MORENO DIAZ DE LA ESPINA,S., FERNANDEZ GOMEZ,M.E., RISUEÑO,M.C. (1978). Nuclear micropuffs in *Allium cepa* cells.II. Behavior under the influence of RNA an protein synthesis inhibitors. *Biol. Cell* 32: 175-186.
- 213-MORENO DIAZ DE LA ESPINA,S., RISUEÑO,M.C., MEDINA,F.J. (1982a). Ultrastructural, cytochemical and autoradiographic characterization of coiled bodies in the plant cell nucleus. *Biol. Cell* 44: 229-238.

- 214-MORENO DIAZ DE LA ESPINA,S., FRANKE,W., KROHNE,G.,TRENDELERBURG,M.F., GRUND,C., SCHEER,V. (1982b). Medusoid fibril bodies: a novel type of nuclear filament of diameter 8 to 12 nm with periodic ultrastructure demonstrated in oocytes of *Xenopus laevis*. *Eur. J. Cell Biol.* 27: 141-150.
- 215-MOYNE,G. (1982). Methods in ultrastructural cytochemistry of the cell nucleus. *Progr. Histochem. Cytochem.* 13: 1-72.
- 216-NAKAYASU,H., UEDA,K. (1984). Small nuclear RNA-protein complex anchors on the actin filaments in bovine lymphocyte nuclear matrix. *Cell Struct. Funct.* 9: 317-325.
- 217-NAKAYASU,H., UEDA,K. (1985). Association of rapidly-labeled RNAs with actin in nuclear matrix from mouse L5178Y cells. *Exptl. Cell Res.* 160: 319-330.
- 218-NAKAYASU,H., UEDA,K. (1986). Preferential association of acidic actin with nuclei and nuclear matrix from mouse leukemia L5178Y cells. *Exptl. Cell Res.* 163: 327-336.
- 219-NAKAYASU,H., BEREZNEY,R. (1989). Mapping replicational sites in the eucaryotic cell nucleus. *J.Cell Biol.*108: 1-11.
- 220-NAKAYASU,H., UEDA,K., BEREZNEY,R. (1989). In: 11th Nuclear Workshop. Program and Abstract. pp137. SUZDAL. URSS.
- 221-NARAYAN,K.S., STEELE,W.J., BUSCH,H. (1967). Ultrastructural aspects of the ribonucleoprotein network in nuclei of WALKER TUMOR and rat liver. *Exptl. Cell Res.* 46: 65-77.
- 222-NEUER,B., WERNER,D. (1985). Screening of isolated DNA for sequences released from anchorage sites in nuclear matrix. *J. Mol. Biol.* 181: 15-25.
- 223-NEWMAN,G.R., JASANI,B., WILLIAMS,E.D. (1982). The preservation of ultrastructure and antigenicity. *J. Microscopy.* 127: RP5-RP6.
- 224-NEWMAN,G.R. (1987). Use and abuse of LR White. *Histochem. J.* 19: 118-120.
- 225-NEWMAN,G.R., HOBOT,J.A. (1987). Modern acrylics for postembedding immunostaining techniques. *J. Histochem. Cytochem.* 35: 971-981.
- 226-NEWPORT,J.W., FORBES,D.J.(1987).The nucleus:structure,functionand dynamics. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 535-565.
- 227-NISHIZAWA,M., TANABE,K., TAKAHASHI,T.(1984). DNA polymerasesand DNA topoisomerases solubilized from nuclear matrices of regenerating rat livers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 124: 917-924.
- 228-NOAILLAC-DEPEYRE,J., AZUM,M. C. ,GERAUD,M.L., MATHIEU,C. ,GAS,N. (1987). Distribution of nuclear matrix proteins in interphase CHO cells and rearrangements during the cell cycle: An ultrastructural study. *Biol. Cell.* 61: 23-32.
- 229-OKADA,T.A., COMINGS,D.E. (1980). A search for protein cores in chromosomes: is the scaffold an artefact?. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 814-832.

- 230-OLSON,M.O.J., WALLACE,M.D., HERRERA,A.H., MARSHALL-CARLSON,L., HUNT,R.C. (1986). Preribosomal ribonucleoprotein particles are a mayor component of a nucleolar matrix fraction. *Biochem.* 25: 484-491.
- 231-OSBORN,M., WEBER,K. (1987). Cytoplasmic intermediate filament proteins and the nuclear lamins, A, B, share the IFA epitope. *Exptl. Cell Res.* 170: 195-203.
- 232-OTTAVIANO,Y., GERACE,L. (1985). Phosphorilation oft he nuclear lamins during interphase and mitosis. *J. Biol. Chem.* 260: 624-632.
- 233-PAOLETTI,J., RECH,J., BRUNEL,C., JEANTUR,P.H. (1980). Constrained configuration of double-stranded ribonucleic acid in HeLa hnRNP and its relaxation by ribonuclease D. *Biochemistry.* 26: 7876-7883.
- 234-PARDOLL,D.M., VOGELSTEIN,B., COFFEY,D.S. (1980). A fixed site of DNA replication in eukaryotic cells. *Cell* 19: 527-536.
- 235-PARDOLL,D.M., VOGELSTEIN,B. (1980). Sequence analysis of nuclear matrix associated DNA from rat liver. *Exptl. Cell Res.* 128: 466-470.
- 236-PARKER,K.A., STEITZ,J. (1987). Structural analysis of the human U3 ribonucleoprotein particle reveal a conserved sequence available for base pairing with pre-rRNA. *Mol. Cell Biol.* 7: 2899-2913.
- 237-PAULIN-LEVASSEUR,M., SCHERBARTH,A., TRAUB,U., TRAUB,P. (1988). Lack of lamins A and C in mammalian hemopoietic cell lines devoid of intermediate filament proteins. *Eur. J. Cell Biol.* 47: 121-131.
- 238-PAULSON,J.R., LAEMMLI,U.K. (1977). The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell.* 12: 817-828.
- 239-PEARSON,E.C., DAVIES,H.G. (1982). A critical evaluation of Bernhard's EDTA regressive staining technique for RNA. *J. Cell Sci.* 54: 207-240.
- 240-PETERS,K.E., COMINGS,S.D.E. (1980). Two dimensional gel electrophoresis of rat liver nuclear washes, nuclear matrix, and hnRNA proteins. *J Cell Biol.* 86: 135.
- 241-PIECK,A.C.M., van der VELDEN,H.M.W., RISKEN,A.A.M., NEISS,J.M., WANKA,F. (1985). Protein composition of the chromosomal scaffold and interphase nuclear matrix. *Chromosoma.* 91:137-144.
- 242-PHI VAN,L., STRATLING,W.H. (1988). The matrix attachment regions of the chicken lysozyme gene comap with the boundaries of the chromatin. *EMBO J.* 7: 655-664.
- 243-PHILIPOVA,N.R., ZHELEV,N.Z., TODOROV,I.T., HADJIOLOV,A.A. (1987). Monoclonal antibody against a nuclear matrix antigen in proliferating human cells. *Biol. Cell.* 60: 1-8.
- 244-PLAGENS,U. (1978). Effect of salt treatment on manually isolated polytene chromosomes from *Chironomus tentans*. *Chromosoma.* 8: 1-19.
- 245-POGO,A.O., CORNUDELLA,L., GREBANIER,A.E., PROCYK,Z., BREZNA,U. (1982). Cross-linking experlments in nuclear matrix: Non histones and snRNA to

- hnRNA. In: The nuclear envelope and the nuclear matrix. MAUL, G.G. (ed) pp223-233. New York: Alan, R., Liss, Inc.
- 246-POLLACK,A., PRUDHOMME,D.L., GREENSTEIN,D.B., IRVIN III,G.L., CLAFLIN,A.J., BLOCK,N.L. (1982). Flow cytometric analysis of RNA content in different cell populations using Pyronin Y and methyl green. *Cytometry*. 3: 28-35.
- 247-POTASHKIN,J.A., ZERGEL,R.F., HUBERMAN,J.A. (1984). Isolation and initial characterization of residual nuclear structures from yeast. *Exptl. Cell Res.* 153: 374-388.
- 248-POUCHELET,M., ANTEUNIS,A., GANSMULLER,A. (1986). Correspondence of two nuclear networks observed "in situ" with the nuclear matrix. *Biol. Cell*. 56: 107-112.
- 249-POWELL,A.J., PEACE,G.W., SLABAS,A.R., LLOYD,C.W. (1982). The detergent-resistant cytoskeleton of higher plant protoplasts contains nucleus-associated fibrillar bundles in addition to microtubules. *J. Cell Sci.* 56: 319-325.
- 250-POZNANOVIC,G., SEVALJEVIC,L. (1986). The retention of core ribonucleoproteins in the nuclear matrix isolated from nuclei treated with the phenantroline-copper complex. *Cell Biol. Int. Rep.* 10: 55.
- 251-PRUSS,R.M., MIRSKY,R., RAFF,M.C., DOWLING,G., ANDERTON,B.H.C. (1981). All classes of intermediate filaments share a common antigenic determinant defined by a monoclonal antibody. *Cell*. 27: 419-428.
- 252-PUVION,E., BERNHARD,W. (1975). Ribonucleoprotein components in liver cell nuclei as visualized by cryoultramicrotomy. *J. Cell Biol.* 67: 200-214.
- 253-PUVION,E., MOYNE,G. (1981). In situ localization of RNA structures. In: *The Cell Nucleus*. 8: 59-115. (Busch, H.)(ed). Academic Press, Inc., New York.
- 254-PUVION,E., VIRON,A., ASSENS,C., LEDUC,E.H., JEANTEUR,P.H. (1984). Immunocytochemical identification of nuclear structures containing snRNPs in isolated rat liver cells. *J. Ultrast. Res.* 87: 180-189.
- 255-RAMAEKERS,F.C.S., SELTEN-VERSTEEGEN,A.M.E., BENEDETTI,E.L., DUNIA,I., BLOEMENDAL,M. (1980). In vitro synthesis of the major lens membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 77: 725-729.
- 256-RAVEH,D., BEN-ZE'EV,A. (1984). The synaptonemal complex as part of the nuclear matrix of the flour moth, *Ephestia kuehniella*. *Exptl. Cell Res.* 153: 99-108.
- 257-RAZIN,S.V. (1987). DNA interactions with the nuclear matrix, and spatial organization of replication and transcription. *Bioassays*. 6: 19-23.
- 258-RAZIN,S.V., CHERNOKVOSTOV,U.V., ROODYN,A.U., ZBARSKY,I.B., GEORGIEV,G.P. (1981). Proteins tightly bound to DNA in the regions of DNA attachment to the skeletal structures of interphase nuclei and metaphase chromosomes. *Cell*. 7: 265-273.
- 259-REDDY,R., BUSCH,H. (1981). U snRNAs of nuclear snRNPs. In: *The Cell Nucleus*. 8: 261. (Busch, H.)(ed). Academic Press. New York.

- 260-REUTER,R., APPEL,B., BRINGMANN,P., RINKE,J., LÜRMAN,R. (1984). 5'-terminal caps of snRNAs are reactive with antibodies specific for 2, 2, 7, -trymethylguanosine in whole cells and nuclear matrices. *Extpl. Cell Res.* 154: 253-267.
- 261-RILEY,D.E., KELLER,J.M., BYERS,B. (1975). The isolation and characterization of nuclear ghosts from cultured HeLa cells. *Biochemistry.* 14: 3005-3013.
- 262-RILEY,D.E., KELLER,J.M. (1976). The polypeptide composition and ultrastructure of nuclear ghosts isolated from mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 444: 899-911.
- 263-RIMM,D.L., POLLARD,T.D. (1989). Purification and characterization of an *Acanthamoeba* nuclear actin-binding protein. *J. Cell Biol.* 109: 585-591.
- 264-RISUEÑO,M.C., MEDINA,F.J., MORENO DIAZ DE LA ESPINA,S. (1982). Nucleolar fibrillar centres in plant meristematic cells: Ultrastructure, cytochemistry and autorradiography. *J. Cell Sci.* 58: 313: 329.
- 265-ROBINSON,S.I., SMALL,D., IDZERDA,R., McKNIGHT,G.S., VOGELSTEIN,B. (1983). The association of transcriptionally active genes with the nuclear matrix of the chicken oviduct. *Nucleic. Acids Res.* 5: 5113-5130.
- 266-ROSS,D.A., YEN,R-W., CHAE,C-B. (1982). Association of globin Ribonucleic Acid and its precursors with the chicken erythroblast nuclear matrix. *Biochemistry.* 21: 764-771.
- 267-SCHEER,V., ROSE,K.M. (1987). Immunocytochemical localization of RNA polymerase I in the fibrillar centers of nucleoli. *Chromosomes Today.* 9: 284-294.
- 268-SCHRÖDER,H.C., ZAHN,R.K., MÜLLER,W.E.G. (1982). Role of actin and tubulin in the regulation of poly(A) polymerase-endoribonuclease IV complex from calf thymus. *J. Biol. Chem.* 257: 2305-2309.
- 269-SCHRÖDER,H.C., MITZGEN,D.E., BERND,A., KURELEC,B., ZAHN,R.K., GRAMZOW,M., MÜLLER,W.E.G. (1984). Inhibition of nuclear envelope nucleoside triphosphatase-regulated nucleocytoplasmic messenger RNA translocation by 9-beta-D-arabinofuranosyl-adenine 5'-triphosphate in rodent cells. *Cancer Res.* 44: 3812-3819.
- 270-SCHRÖDER,H.C., BACHMANN,M., DIEHL-SEIFERT,B., MÜLLER,W.E.G. (1987). Transport of mRNA from nucleus to cytoplasm. *Progr. Nucl. Acid. Res. Molec. Biol.* 45: 98: 142.
- 271-SCHRÖDER,H.C., BACHMANN,M., MÜLLER,W.E.G. (1989). Methods for investigating nucleocytoplasmic transport of RNA. Gustav. Fisher (ed) Verlag. Stuttgart. New York.
- 272-SCOTT,J.E. (1967). On the mechanism of the methyl-green-pyronin stain for nucleic acids. *Histochemie.* 9: 30-47.
- 273-SEVALJEVIC,L., BRAJANOVIC,N., TRAJKOVIC,D. (1982). Cortisol-induced stimulation of nuclear protein phosphorylation. *Molec. Biol. Rep.* 8: 225-232.

- 274-SGORBATI,S., LEVI,M., SPARVOLI,E., TREZZI,F., LUCHINI,G. (1986). Cytometry and flow cytometry of 4'-6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI)-stained suspensions of nuclei released from fresh and fixxed tissues of plants. *Phisiol. Plantarum*. 13089: 86-227.
- 275-SHAPER,J.H., COFFEY,D.S. (1977). The nuclear protein matrix: Isolation and characterization. *Federation Proc.* 36: 859.
- 276-SHAPER,J.H., PARDOLL,D.M., KAUFFMANN, S.H., BARRACK, E.R., VOGELSTEIN,B., COFFEY,D.S. (1979). The relations of the nuclear matrix to cellular structure and function. *Adv. Enz. Reg.* 17: 213-247.
- 277-SHELTON,K.R., EAGLE,P.M. (1979). Analysis of the nuclear envelope polypeptides by isoelectric focusing and electroforesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90: 425-430.
- 278-SHIOMI,J., PONERS,J., BOLLA,R.L., van NGUYEN,T., SCHLESSINGER,D. (1986). Proteins and RNA in mouse L-cell core nucleoli and nucleolar matrix. *Biochemistry.* 25: 5745-5751.
- 279-SKOGLUND,U., ANDERSON,K., BJORKTROTH,B., LAMB,H.M., DANEHOLT,B. (1983). Visualization of the formation and transport of a specific hnRNP particle. *Cell.* 34: 847-855.
- 280-SMETANA,K., STEELE,W.J., BUSCH,H. (1963). A nuclear ribonucleoprotein network. *Exptl. Cell Res.* 31: 198-201.
- 281-SMITH,H.C., BEREZNEY,R. (1980). DNA polymerase alfa is tightly bound to the nuclear matrix of actively replicating liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97: 1541-1547.
- 282-SMITH,H.C., BEREZNEY,R. (1983). Dynamics domains of DNA polymerase alfa in regenerating rat liver. *Biochemistry.* 22: 3042-3046.
- 283-SMITH,H.C., FISHER,P.A. (1989). Interconversion of *Drosophila* nuclear lamin isoforms during oogenesis, early embryogenesis, and upon entry of cultured cells into mitosis. *J. Cell Biol.* 109: 495-504.
- 284-SMITH,H.C., OCHS,R.L., FERNANDEZ,E.A., SPECTOR,D. (1986). Macromolecular domains containing nuclear protein p107 and U-sn protein 28: further evidence for an in situ nuclear matrix. *Mol. Cell. Biochem.* 70: 151-168.
- 285-SMITH,H.C., PUVION,E., BUCHOLTZ,L.A., BEREZNEY,R. (1984). Spatial distribution of DNA loop attachment and replicational sites in the nuclear matrix. *J. Cell Biol.* 99: 1794-1802.
- 286-SNOW,C.M., SENIOR,A., GERACE,L. (1987). Monoclonal antibodies identify a group of nuclear pore complex glycoproteins. *J. Cell Biol.* 104: 1143-1156.
- 287-SPECTOR,D.L. (1984). Colocalization of U1 and U2 small nuclear RNAs by immunocytochemistry. *Biol. Cell.* 51: 109-112.
- 288-SPECTOR,D.L., SMITH,H.C. (1986). Redistribution of U-snRNPs during mitosis. *Exptl. Cell Res.* 163: 87-94.

- 289-SPECTOR,D.L., OCHS,R.L., BUSCH,H. (1984). Silver staining, immunofluorescence and immunoelectron microscopic localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23. *Chromosoma*. 90: 139-148.
- 290-SPIKER,S. (1985). Plant chromatin structure. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 36: 235-253.
- 291-STEEL,W.J., BUSCH,H. (1963). Studies on the acidic nuclear proteins of the walker tumour and the liver. *Cancer. Res.* 23: 1153-1163.
- 292-STEWART,C., BURKE,B. (1987). Teratocarcinoma stem cells and early mouse embryos contain only a single major lamin polypeptide closely resembling lamin B. *Cell*. 51: 383-392.
- 293-STICK,R. (1987). Molecular Regulation of nuclear events in mitosis and meiosis. pp43-66. Schlegel, R.A., Halleck, M.S., Rao.P.N., (eds). *Acad. Press, Orlando, FL*.
- 294-STICK,R. (1988). cDNA cloning of the developmentally regulated lamin III of *X. laevis*. *EMBO J.* 7: 3189-3197.
- 295-STICK,R., HAUSEN,P. (1980). Immunological analysis of nuclear lamina proteins. *Chromosoma*. 80: 219-236.
- 296-STICK,R., HAUSEN,P. (1985). Changes in the nuclear lamina composition during early development of *X. laevis*. *Cell*. 41: 191-200.
- 297-STICK,R., ANGRES,B., LEHNER,C.F., NIGG,E.A. (1988). The fates of chicken nuclear lamin proteins during mitosis: evidence for a reversible redistribution of lamin B2 between inner nuclear membrane and elements of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 107: 397-406.
- 298-STIRLING,J.W. (1990). Immuno and affinity probes for electronmicroscopy: A review of labeling and preparation techniques. *J. Histochem. Citochem.* 38: 145-157.
- 299-STOLYAROV,S.D. (1984). Isolation and characterization of the nuclear matrix of the onion *Allium cepa*. *Cytologia*. 26: 874-878.
- 300-STWART,C., BURKE,B. (1987). Teratocarcinoma stem cells and early mouse embryos contain only a single mayor lamin polypeptide closely resembling lamin B. *Cell*. 51: 383-392.
- 301-SWIFT,H. (1963). Cytochemical studies of nuclear fine structure. *Exptl. Cell Res.* Suppl. 9: 54-67.
- 302-TODOROV,I.T., HADJIOLOV,A.A. (1979). A comparison of nuclear and nucleolar matrix proteins from rat liver. *Cell Biol. Int. Rep.* 3: 753-757.
- 303-THIRY,M., THIRY-BLAISE,L. (1989). In situ hybridization at the electron-microscope level: an improved method for precise localization of ribosomal DNA and RNA. *Eur. J. Biol.* 50: 235-243.
- 304-TOKUYASU. (1984). Immuno-cryoultramicrotomy. In: Immunolabeling for electron microscopy. Polak, J.M., Varndell, I.M.(eds). Amsterdam, New York, Oxford. Elsevier Science Publisers.

- 305-TRAGANOS,F., CRISSMAN,H.A., DARZINSKIEWICZ,Z. (1988). Staining with Pyronin Y detects changes in conformation of RNA during mitosis and hyperthermia of CHO cells. *Exptl. Cell Res.* 179: 535-544.
- 306-TUBO,R.A., BEREZNEY,R. (1987a). Identification of 100 and 150S DNA polymerase alfa-primase megacomplexes solubilized from the nuclear matrix of regenerating rat liver. *J. Biol. Chem.* 262: 5857-5865.
- 307-TUBO,R.A., BEREZNEY,R. (1987b). Nuclear matrix-bound DNA primase to the nuclear matrix in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 262: 6637-6642.
- 308-TUBO,R.A., SMITH,H.C., BEREZNEY,R. (1985). The nuclear matrix continues DNA synthesis at in vivo replicational forks. *Biochem. Biophys. Acta.* 825: 326-334.
- 309-TURNER,B.M., FRANCHI,L. (1987). Identification of protein antigens associated with the nuclear matrix and with clusters of interchromatin granules in both interphase and mitotic cells. *J. Cell Sci.* 87: 269-282.
- 310-Van der VELDEN,H.M.W., van WILLIGEN,G., van WETZELS,R.H.W., WANKA,F. (1984). Attachment of origins of replication to the nuclear matrix and the chromosomal scaffold. *FEBS* 1478. 171: 13-16.
- 311-Van EEKELEN,C.A.G., van VENROIJ,W.J. (1981). HnRNA and its attachment to a nuclear protein matrix. *J. Cell Biol.* 88: 554-563.
- 312-Van EEKELEN,C.A.G., SALTEN,M.H.L., HABETS,W.J.A., Van de PUTTE,L.B.A., Van VENROOIJ,W.J. (1982). On the existence of an internal nuclear protein structure in HeLa cells. *Exptl. Cell Res.* 141: 181-190.
- 313-VAZQUEZ-NIN,G.H., ECHEVERRIA,O.M., MINGUEZ,A., MORENO DIAZ DE LA ESPINA, S., FAKAN,S., MARTIN,T.H. (1991). Application of mild loosening and immunocytochemistry to the characterization of ribonucleoprotein components of rootmeristematic cell nuclei of the tomato. *Exptl. Cell Res.* (en prensa).
- 314-VERHEIJEN,R., KUISPERS,H.J.H., WOOIJ,J.P., van VENROOIJ,W., RAMAEKERS,F. (1986). Protein composition of nuclear matrix preparations from HeLa cells: an immunological approach. *J. Cell Sci.* 80: 103-122.
- 315-VERHEIJEN,R., van VENROOIJ,W., RAMAEKERS,F. (1988). The nuclear matrix: structure and composition. *J. Cell Sci.* 90: 11-36.
- 316-VERHEIJEN,R., KUISPERS,H.J.H., SCHLINGEMANN,R.O., BACHNER,A.L.M., vanDRIEL, R., BRAKENHOFF,G.J., RAMAEKERS,F.C.S. (1989). Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. I. Intracellular localization during interphase. *J. Cell Sci.* 92: 123-130.
- 317-VOGELSTEIN,B., PARDOLL,D.M., COFFEY,D.S. (1980). Supercoiled loops and eucaryotic DNA replication. *Cell.* 22: 79-85.
- 318-WAITZ,W., LOIDL,P. (1988). In situ preparation of the nuclear matrix of Physarum polycephalum: ultrastructural and biochemical analysis of different matrix isolation procedures. *J. Cell Sci.* 90: 621-628.
- 319-WANKA,F., MULLENDRES,L.H.F., BENKERS,A.G.M., PENNING,S,L.J., AELEN,J.M.A.,

- EYGENSTEIN, J. (1977). Association of nuclear DNA with a rapidly sedimenting structure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74: 739-747.
- 320-WANKA, F., PIECK, A., BEKERS, G.M., MULLENDERS, L.H.F. (1982). The attachment of replicating DNA to the nuclear matrix. In: *The nuclear envelope and the nuclear matrix*. Alan, R., Liss, (ed) Inc, New York.
- 321-WASSEF, M. (1979). A cytochemical study of interchromatin granules. *J. Ultrastruc. Res.* 69: 121-133.
- 322-WEBER, K., OSBORN, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406-4412.
- 323-WEBB, T.E., SCHUMM, D.E., PALAYOOR, T. (1981). Nucleocytoplasmic transport of mRNA. In: *The Cell Nucleus*, vol 9. Busch, H.(ed). Academic Press. London.
- 324-WOLF, B., LESNAM, J.A., REICHMANN, M.E. (1970). A mechanism of the irreversible inactivation of bovine pancreatic ribonuclease by diethylpyrocarbonate. *Eur. J. Biochem.* 13: 519-525.
- 325-WOLFE, J. (1980). A possible skeletal substructure at the macronucleus of *Tetrahymena*. *J. Cell Biol.* 84: 160.
- 326-WOLIN, S.L., KROHNE, G., KIRSCHNER, M.W. (1987). A new lamin in *Xenopus* somatic tissues displays strong homology to human lamin A. *EMBO J.* 6: 3809-3818.
- 327-WOOD, S.H., COLLINS, J.M. (1986a). Nuclear matrix generation during reactivation of avian erythrocyte nuclei: An analysis of the protein traffic in hybrids. *J. Cell Sci.* 84: 105-127.
- 328-WOOD, S.H., COLLINS, J.M. (1986b). Preferential binding of DNA primase to the nuclear matrix in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 261: 71119-7126.
- 329-WOODCOCK, C., WOODCOCK, H. (1986). Nuclear matrix generation during reactivation of avian erythrocyte nuclei: an analysis of the protein traffic in cybrids. *J. Cell Sci.* 84: 105-127.
- 330-WUNDERLICH, H., WESTPHAL, M., ARMBRUSTER, B., LABHART, P. (1983). Comparative studies on the structural organization of membrane-depleted nuclei and metaphase chromosomes. *Chromosoma.* 88: 241-248.
- 331-ZBARSKY, I.B., DEBOV, S.S. (1948). Proteins of cell nuclei. *Doklady Akad. Nank. URSS.* 63: 795-798.